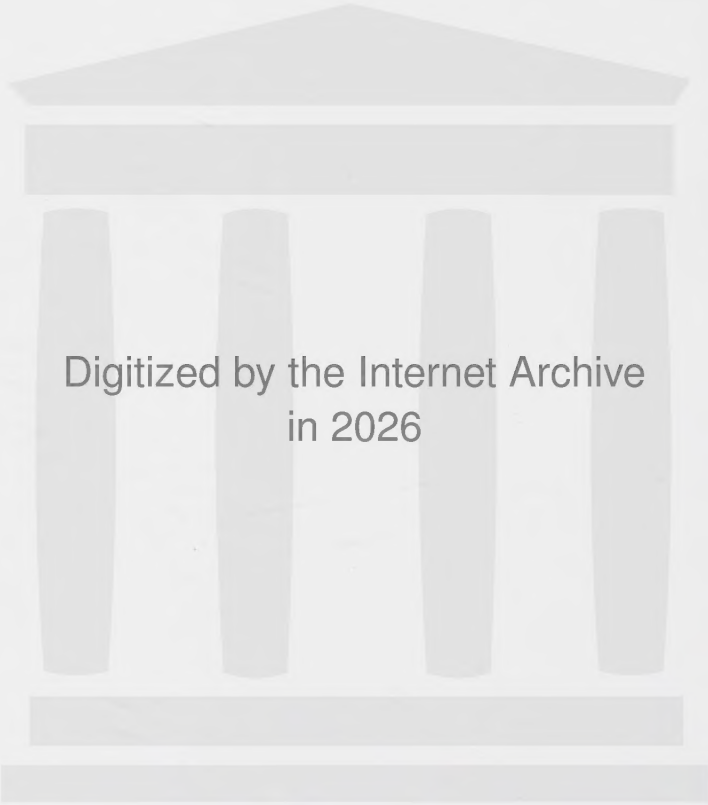




Digitized by the Internet Archive
in 2026

Biochemische Charakteristika, Dissoziation und Rekonstitution der chitosomalen Chitinsynthetase von *Agaricus bisporus*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der
Universität Zürich

von
EDGAR HÄNSELER
von Rafz ZH

Begutachtet von Frau Prof. Dr. D.M. Rast



Juris Druck + Verlag Zürich
1983



ISBN 3 260 04968 1

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	5
II	MATERIAL UND METHODEN	11
	1. Kultivation des Pilzmaterials	11
	2. Gewinnung und Bestimmung von Charakteristika der Chitinsynthetase	13
	3. Chemische Analyse der Hyphenwand	18
	4. Analyse von Lipiden	24
	5. Gaschromatographie	26
	6. Elektronenmikroskopie	27
	7. Röntgendiffraktometrie	28
	8. Varia	28
	9. Herkunft spezieller Chemikalien	28
III	EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE	30
	A. SUBMERSKULTUR VON CHAMPIGNONMYCELIUM	30
	B. ZUSAMMENSETZUNG DER MYCELIALEN ZELLWAND VON A. <i>BISPORUS</i>	32
	1. Quantitierung der wichtigsten Wandfrak- tionen	32
	2. Detailanalyse einzelner Wandfraktionen	32
	2.1. S-Glucan (α -1,3-Glucan)	32
	2.2. Chitin-Fraktion	35
	C. IN VITRO-SYNTHESE VON CHITIN UND DEREN BEEIN- FLUSSUNG DURCH ANTIBIOTIKA	37
	1. Isolation von chitosomaler Chitinsynthe- tase aus Champignonmycelium	37
	1.1. Reinigung und Bestimmung der ultra- strukturellen Charakteristika der chitosomalen Chitinsynthetase	37

1.2. Identifikation des Reaktionsproduktes	45
2. Regulatorische Eigenschaften des Enzyms	46
3. Modulation der Aktivität von Chitinsynthetase durch fungitoxische Antibiotika	47
3.1. Nikkomycine	47
3.2. Saponine	48
3.3. Amphotericin B-methylester	51
4. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w}$ von Chitosomen	51
D. DISSOZIATION UND REKONSTITUTION VON CHITOSOMEN	52
1. Dissoziation von Chitosomen in aktive Untereinheiten (16 S)	52
2. Gewinnung von 16 S-Chitinsynthetase aus einer 'mixed-membrane'- und einer Wandfraktion	57
3. Eigenschaften der 16 S-Chitinsynthetase	57
4. Rekonstitution von Chitosomen aus 16 S-Subpartikeln	62
E. EIN VERGLEICH DER CHITOSOMALEN UND DER ZELLULAEREN LIPIDE VON CHAMPIGNONMYCELIUM	67
1. Auftrennung in Lipidklassen	67
2. Analyse der Phospholipid-Fraktion	68
3. Fettsäurezusammensetzung von chitosomalen und zellulären Lipidfraktionen aus <i>A.bisporus</i>	69
4. Bedeutung der leicht-extrahierbaren Lipide für die Aktivität der chitosomalen Chitinsynthetase	71
IV SCHLUSSFOLGERUNGEN UND DISKUSSION	73
V ZUSAMMENFASSUNG	91
VI LITERATURVERZEICHNIS	95

I. EINLEITUNG

Es ist eine Grundthese der mykologischen Entwicklungsbiologie, dass die Art des Stoffwechsels von Matrix- und Fibrillärkomponenten der Wand (d.h. das Verhältnis der Aktivitäten der respektiven katabolischen und synthetisierenden, an der Zelloberfläche wirkenden Enzyme) den Hauptfaktor für die Bestimmung der Form eines Pilzes darstellt (Bartnicki-Garcia 1968 und 1973 sowie dort zitierte Arbeiten). Besonders gut untersuchte Organismen, in denen Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Wand mit Veränderungen der Form korreliert sind, stellen *Mucor rouxii* (Bartnicki-Garcia 1968), *Blastomyces dermatitidis* (Kanetsuna & Carbonell 1971), *Paracoccidioides brasiliensis* (Kanetsuna & Carbonell 1970) und *Histoplasma capsulata* (Kanetsuna et al. 1974) dar, wobei sich beim erstgenannten Organismus die durch erhöhte CO₂-Konzentration induzierte Mycel/Hefe (M/Y)-Konversion in einer Erhöhung des Mannan- und des Protein-Gehaltes der Wand manifestiert, in den anderen Fällen die als Thermomorphose entstehende Hefe-Form sich durch eine Veränderung der Löslichkeit der Glucane in KOH und einen niedrigeren Chitin-Gehalt auszeichnet. Es ist demnach ein logisches Korrelat zur Hypothese der Identität von Zellmorphogenese mit Wandmorphogenese, dass modifizierende Agentien der Entwicklung eines Pilzes direkt oder indirekt den Wandmetabolismus beeinflussen müssen. Als solche Systeme seien der bei *M. rouxii* durch hohe CO₂- und Hexosekonzentrationen (Bartnicki-Garcia & Nickerson 1962) oder Phenethylalkohol (Terenzi & Storck 1969) und bei *Phialophora verrucosa* durch Mn²⁺ (Reiss & Nickerson 1974) steuerbare M/Y-Dimorphismus sowie die Induktion protoplastenähnlicher Strukturen durch Polyoxin D bei *Cochliobolus miyabeanus* (Endo et al. 1970) und anderen Pilzen (vgl. Gooday 1979), genannt. Im letzteren Fall ist bewiesen worden, dass der modifizierende Faktor tatsächlich über den Wandmetabolismus wirksam wird, denn das Antibiotikum hemmt spezifisch die Chitinsynthetase (ibid.).

Abb. 1. Enzyme des Metabolismus von Chitin in Pilzen. I Glutamin-Fructose-6-phosphat-Aminotransferase; II Glucosaminphosphat-Acetyltransferase; III Glucosaminphosphat-Isomerase; IV UDPAcetylglucosamin-Pyrophosphorylase; V Chitinsynthetase (E.C. 2.4.1.16=UDP-2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose: Chitin 4- β -Acetamido-deoxy-Glucosyltransferase; VI N-Acetylglucosamin-Kinase; VII Chitinase (E.C. 3.2.1.14=Poly(1,4- β -(2-acetamido-2-deoxy-D-glucosid))-Glycanohydrolase); VIII Chitobiase; IX N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase; X Glucosamin-6-phosphat-Deaminase (Nach Shepherd et al. 1980, modifiziert)

Chitinsynthetase wurde bisher in Form von sog. Chitosomen, welche Miniorganellen darstellen (Bracker et al. 1976; Ruiz-Herrera et al. 1977; Mills & Cantino 1981), und von Plasmalemmafragmenten (Duran et al. 1975; Vermeulen et al. 1979) sowie als bei Inkubation von 'mixed-membrane'-Fraktionen (Gooday & de Rousset-Hall 1975; Duran & Cabib 1978) oder von Chitosomen (Ruiz-Herrera et al. 1980) mit Digitonin entstehendes "solubilisiertes" Enzym isoliert. Es wird angenommen, dass die Chitosomen als mobile cytoplasmatische Träger von Chitinsynthetase an die Zelloberfläche fungieren, wo die Bildung der Chitinmikrofibrillen erfolgt (Bartnicki-Garcia et al. 1978). Die Liste der Spezies, aus denen chitosomale Chitinsynthetase isoliert wurde, umfasst Vertreter aller wichtigen Pilzklassen und einen weiten Bereich verschiedener Zellformen, von der nackten Zoospore bis zu mycelialen Aggregaten, wie sie im Basidiokarp vorliegen. In keinem dieser Fälle wurde jedoch eine myceliale Chitinsynthetase so weitgehend untersucht, wie dies für das betreffende Enzym aus Hefe-Zellen zutrifft (für Literaturzitate vgl. Bartnicki-Garcia et al. 1979; Cabib et al. 1979), obwohl die Beschreibung des Hyphenwachstums in biochemischen Begriffen eine wesentliche Voraussetzung für das nähere Verständnis auch komplexerer morphogenetischer Vorgänge, wie z.B. der Sporenkeimung, Fruktifikation und Sporengese, ist. Ein möglicherweise generelles Auftreten von

Chitosomen in allen Chitin synthetisierenden Organismen (für die systematische Verbreitung von Chitin vgl. Muzzarelli 1977) wird dadurch angezeigt, dass auch ausserhalb des Pilzreiches, im Insekt *Tribolium castaneum*, den Chitosomen sehr ähnliche Partikel mit Chitinsynthetase-Aktivität gefunden worden sind (Cohen & Casida 1980; Cohen 1982).

Chitosomen stellen vesikuläre, durch eine 6-12 nm dicke membranähnliche Struktur abgegrenzte Partikel mit einem Durchmesser von 40-70 nm dar, die bei Inkubation mit Substrat (UDPGlcNAc) lange, dünne Mikrofibrillen bilden, welche mit Chitin identisch sind (Bracker et al. 1976). Nach Ruiz-Herrera et al. (1977) beträgt der durch präparative Ultrazentrifugation bestimmte Sedimentationskoeffizient der Chitosomen 105 S, das mittels Gelchromatographie ermittelte MW $7 \cdot 10^6$. Behandlung von Chitosomen mit Digitonin liefert 16 S-Partikel mit Chitinsynthetase-Aktivität (MW = $5 \cdot 10^5$: Ruiz-Herrera et al. 1980) – ebenso die Extraktion mycelialer Wände von *M. rouxii* (Bartnicki-Garcia et al. 1979). Die Behandlung einer 'mixed-membrane'-Fraktion von *Coprinus cinereus* (Gooday & de Rousset-Hall 1975) und Plasmalemmafragmenten aus *Saccharomyces cerevisiae* (Duran & Cabib 1978) mit dem Saponin führt zu Partikeln, die mit dem 16 S-Enzym aus *Mucor* vergleichbar sind.

Wie das chitosomale ist auch das mittels Digitonin dissoziierte Enzym zymogen (Ruiz-Herrera et al. 1980) und durch ein lösliches Protein aus *M. rouxii* (Lopez-Romero et al. 1978), welches kürzlich als eine Chitinase identifiziert worden ist (Lopez-Romero et al. 1982), stark hemmbar. Andere Eigenschaften oder kinetische Daten der 16 S-Chitinsynthetase wurden – wohl infolge zu geringer Poolgrössen – bisher nicht bestimmt. Im Gegensatz zu den langen, gleichmässig dicken Fibrillen, die von Chitosomen gebildet werden, scheint das Produkt des mit Digitonin dissoziierten Enzyms aus kurzen, nadelförmigen Segmenten zu bestehen. Physische Kontinuität zwischen diesen und den 16 S-Partikeln ist nicht nachgewiesen worden (Ruiz-Herrera et al. 1980).

Wurde durch Digitonin dissoziierte Chitinsynthetase in einen saponinfreien Gradienten zentrifugiert, so traten neben 16 S-Einheiten auch Chitin synthetisierende, als partiell reaggregierte Chitosomen interpretierbare Partikel auf (Bartnicki-Garcia et al. 1979). Die Population war jedoch sehr heterogen und setzte sich aus Partikeln zusammen, deren Sedimentationskoeffizienten zweifellos wesentlich geringer als diejenigen von nativen Chitosomen waren.

Die Wahl von *Agaricus bisporus* als Testobjekt für die vorliegende Studie wurde aus den folgenden Gründen getroffen: (i) die Ultrastruktur und die Chemie seiner Hyphenwand sind recht gut bekannt (Michalenko et al. 1976); (ii) der Pilz hat einen ungewöhnlich hohen Chitingehalt (ibid.; Hänseler 1980), so dass die Annahme der Existenz eines entsprechend effizienten Chitin synthetisierenden Systems naheliegt; (iii) der Pilz kann in pelletfreier Submerskultur in einem synthetischen, eine hohe Wachstumsrate ermöglichenden Medium (D.M. Rast, G.A. Dütsch, H. Schatzmann, und E. Hänseler, in Vorbereitung) gezogen werden, also in einem System, das es erlaubt, den Einfluss von Nährstoffen und von physikalischen Umgebungsfaktoren, wie z.B. CO₂, - die sowohl als Modifikatoren des mycelialen Wandmetabolismus als auch der Hyphenmorphogenese bekannt sind (Mahadevan & Tatum 1965; Wessels 1966; Bartnicki-Garcia 1968) - auf die Chitinsynthese und das Hyphenspitzenwachstum zu studieren; (iv) die Bildung von Fruchtkörperprimordien, in der Hyphe selbst als auch zwischen Hyphen ablaufende komplexe morphogenetische Vorgänge beinhaltend (vgl. Burnett 1976), ist ebenfalls kausal mit Änderungen im Wandmetabolismus verknüpft, welche wahrscheinlich auch den β -Glucan-Chitinkomplex betreffen (Sietsma et al. 1977; Sietsma & Wessels 1981); und (v) die Verfügbarkeit von gereinigter Chitinsynthetase aus *A. bisporus* würde die Möglichkeit einer in vitro-Synthese von Chitin-Melanin-Komplexen eröffnen, wie sie in den Sporen dieses Organismus (Rast & Hollenstein 1977) und von *M. rouxii* (Bartnicki-Garcia & Reyes

1964) sowie in *Aspergillus nidulans* (Bull 1970) und wahrscheinlich in vielen anderen Pilzen vorkommen, wobei besondere Vorteile darin bestünden, dass das Substrat der Melanogenese in *A. bisporus* bekannt ist (Rast et al. 1979; 1981a; Stüssi & Rast 1981) und die Tyrosinase dieses Organismus sehr häufig zur Untersuchung des Mechanismus der Melaninsynthese Verwendung gefunden hat (Swan 1974).

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die wichtigsten Wandkomponenten der Hyphen von homogenem Submersmycelium von *A. bisporus* zu analysieren, dessen chitosomale Chitinsynthetase zu isolieren und sowohl biochemisch als auch ultrastrukturell zu charakterisieren, den Mechanismus der Dissoziation von Chitosomen und die kinetischen Eigenschaften der 16 S-Chitinsynthetase zu bestimmen, einen direkten Beweis für das vermutete Phänomen einer "self-assembly" von 16 S-Partikeln zu Chitosomen zu liefern, um so die Fibrillogenese in einem wegen der Abwesenheit von Membranen einfacheren als dem bisher beschriebenen nativen chitosomalen System studieren zu können. Besondere Beachtung soll schliesslich auch die Untersuchung der Wirkung verschiedener antifungaler Agentien - z.T. bereits als Fungizide verwendet - auf die chitosomale und die 16 S-Chitinsynthetase erfahren.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Kultivation des Pilzmaterials

1.1. Kulturtechnik

Zur Gewinnung von Impfmateriel für Rührkulturen von *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., ATCC 38258 (Stamm A-6 Hauser) wurden steril gewonnene Sporen (Rast & Stäuble 1970) in 10 ml Kartoffel-Xylose-Nährlösung (1% Xylose, 0,05% Difco-Hefe-Extrakt) bei 24 °C während 10-14 d inkubiert. Zwei ml dieser Suspension überimpfte man in einen 250 ml Schikanen-Erlenmeyer-Kolben (SEK), enthaltend 50 ml Medium (s. unten). 10 ml dieser Vorkultur dienten als Inoculum für einen 1000 ml-SEK, 400 ml Medium enthaltend. Aus einer solchen Stammkultur wurde 40 ml Inoculum in einen 2 L-SEK übertragen und während 4 d bei 28 °C im Konstantraum inkubiert. Die Kulturen waren mit einem Zapfen aus hydrophober Watte verschlossen.

1.2. Kulturmedium

400 ml Medium enthielten 380 ml autoklavierte Komponente A und 20 ml steril dazu filtrierte Komponente B (Millipore-Filter, 0,22 µm).

Herstellung des Mediums (D.M. Rast, G.A. Dütsch, H. Schatzmann und E. Hänseler, in Vorbereitung) :

Komponente A (ad 950 ml) :	1,5	g	NH ₄ Cl
	1,0	g	KH ₂ PO ₄
	0,35	g	Na ₂ SO ₄
	0,35	g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	0,12	g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	0,6	g	Tween 80
	100	ml	Succinat-NaOH-Puffer
			pH 5,3; 0,5 M

	1	ml	Spurenelement-	
			lösung (s. unten)	
Komponente B (ad 50 ml) :	10	g	Fructose	
	1	ml	Thiamin·HCl-Lösung	
			0,7 g/L	
	1	ml	Niacin-Lösung	
			0,4 g/L	
Spurenelemente :				
		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,7 g/L	
		MnSO ₄ · H ₂ O	0,7 g/L	
		ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7 g/L	
		FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,35 g/L	
		NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	0,35 g/L	

1.3. Kultivation von *Schizophyllum commune* (CBS 249.69)

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 250 ml Nähr-
lösung in einem SEK (1 L) mit einem gut bewachsenen Fest-
agarstück (ca. 1 cm²) beimpft. Um die Bildung von Pellets
zu unterdrücken (vgl. Solomons 1975), bewegte man die
Kulturen mittels Magnetührstab und erhielt so eine sehr
feine Mycelsuspension. Diese diente anschliessend als Ino-
culum für die Folgekulturen, welche wiederum homogenes
Mycelwachstum zeigten. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C
während 5 d (Vorkultur 7 d) auf einem synthetischen Medium
(Niederpruem et al. 1965). Es enthielt pro Liter :

2% Glucose, 1 g L-Asparagin, 0,46 g KH₂PO₄
1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄ · 7 H₂O und 100 µg
Thiamin·HCl.

2. Gewinnung und Bestimmung von Charakteristika der Chitinsynthetase

2.1. Isolation und Reinigung des Enzyms

Mycelium von *A. bisporus* wurde auf einer Glasfilterfritte (Gl) vom Medium getrennt, mit $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und in einem Braun MSK-Homogenisator aufgeschlossen (70 ml-Flasche, enthaltend 25 ml Mycelsuspension und 45 g Glaskugeln mit $\varnothing$ 0,5 mm).

Von zwei Modifikationen abgesehen, erfolgte die Isolation der Chitosomen nach dem Verfahren von Bartnicki-Garcia et al. (1978) und umfasste folgende Schritte :

- (1) Separation der Glaskugeln vom Zellhomogenat mittels Filtration durch ein Käsetuch
- (2) 4000 X g-Zentrifugation des Homogenates, 5 min (Sorvall RC-5)
- (3) 54'000 X g-Zentrifugation des Ueberstandes von (2), 45 min (Beckman L8, SW-28 Rotor)
- (4) Permeationschromatographie des Ueberstandes von (3) auf einem Agarose-Gel (Bio-Rad A-5m; Säule : 35 x 2,3 cm)
- (5) Poolen der bzgl. Chitinsynthetase-Aktivität aktivsten Fraktionen des Eluates (total 18 ml) und Konzentrieren (auf ca. 2 ml) mittels einer Amicon-Ultrafiltrationseinheit (XM-300 Membran)
- (6) Zentrifugation (Rotor SW-28; 104'000 X g; 2 h 40 min) in einen Saccharose-Dichtegradienten (5-50%, 36 ml). Auftrennen desselben in 1 ml-Fractionen und bestimmen der Chitinsynthetase-Aktivität

Bei Präparationen, die für eine elektronenmikroskopische Analyse vorgesehen waren, wurde der Bio-Gel-Pool mit RNase inkubiert (20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ RNA; 10 min; 30 °C) und anschließend zentrifugiert (10'000 X g, 10 min). RNA aus Bäckerhefe diente als Referenz ($A_{254} = 11$ entspricht 1 mg/ml).

2.2. Chitinsynthetase-Assay und Applikation von Inhibitoren

Alle Lösungen wurden in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ Puffer, pH 7,0, enthaltend 10 mM MgCl_2 , hergestellt. Das Standardreaktionsmedium enthielt in einem Totalvolumen von 125 μl : Enzym-Präparation (50 μl), 50 μl Pronase (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), UDP- $[\text{}^4\text{C}]\text{-GlcNAc}$ (0,4 mM, 22'000 dpm) und GlcNAc (20 mM). Zur Bestimmung der 16 S-Chitinsynthetase-Aktivität wurde folgender Ansatz verwendet : Enzym-Präparation (75 μl), 50 μl Pronase (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), UDP- $[\text{}^4\text{C}]\text{-GlcNAc}$ (0,6 mM, 50'000 dpm) und GlcNAc (10 mM). Die Reaktionszeit betrug, je nach Enzymaktivität, 10-20 min. Als spezifische Aktivität der Chitinsynthetase gilt die Inkorporation von 1 nmol GlcNAc/min·mg Protein in Chitin.

Die Bestimmung des radioaktiven Chitins erfolgte mittels einer Filtrationsmethode (Bartnicki-Garcia et al. 1978), bei welcher die Proben nach beendigter Reaktion durch Filter-Rondellen (Whatman GF/C, Millipore Filtrationsgerät 1225) passiert und diese mit 1 M HOAc/95% EtOH (8 : 2) gewaschen, getrocknet (80 °C, 20 min), mit Scintillationscocktail versetzt (0,2% PPO und 0,01% POPOP in Toluol) und in einem Scintillationszähler (Nuclear Chicago, Unilux-II oder Beckman-LS 7800) auf Radioaktivität geprüft werden.

Als Lösungsmittel für Nikkomycine und Saponine diente Puffer, für Amphotericin B-methylester 2% N,N-Dimethylformamid. Alle Inhibitoren wurden in 25 μl zum Assay pipettiert. Um das Totalvolumen des Assays konstant zu halten, wurde die Pronase bei diesen Experimenten ebenfalls in 25 μl appliziert (in doppelter Konzentration: vgl. oben).

2.3. Identifikation des Reaktionsproduktes

Sie erfolgte durch den Nachweis der Bildung von ^{14}C -N-Acetylglucosamin, radioaktiver N,N'-Diacetylchitobiose und anderer markierter Verbindungen – bei welchen es sich aufgrund ihrer chromatographischen Mobilität (s. unten) um Chitooligomere handeln dürfte – nach Inkubation des präsumptiven ^{14}C -Chitins mit Chitinase. Zur Synthese grösserer Mengen des Reaktionsproduktes wurde 0,5 ml Enzym (chitosomale Fraktion oder 16 S-Einheiten) mit 0,5 ml Substrat/Aktivator-Mischung (UDPGlcNAc : 2 mM, 100'000 dpm) während 16 h inkubiert, worauf die Trennung von Produkt und Edukten wie unter II/2.2. beschrieben erfolgte. Die auf dem Filter zurückbleibende Substanz wurde intensiv gewaschen, mit dem Filter in ein Sovirell-Röhrchen übertragen, mit 1 ml Puffer (MOPS, pH 5,8; 50 mM) versetzt, mazeriert und nach Zufügen von 1 ml Chitinase (4 mg/ml) während 15 h bei 28 °C inkubiert. Die Auftrennung der Hydrolyseprodukte wurde auf Kieselgel-Platten (Merck Nr. 5554, 0,2 mm Schichtdicke) mit Propanol/H₂O (7:3) als Fließmittel durchgeführt. Besprühen mit Natriumperiodat/Benzidin diente zum Nachweis der Referenzsubstanzen; die Lokalisation der markierten Verbindungen erfolgte mit einem DC-Scanner (Berthold LB 2723).

2.4. Extraktion von 16 S-Chitinsynthetase aus Wand- und 'mixed-membrane'-Fraktionen

Der Aufschluss des Myceliums und die Abtrennung der Glaskugeln erfolgten wie unter 2.1. beschrieben. Das Zellhomogenat, das gewaschene 4000 X g-Sediment (aufgenommen in 20 ml Puffer) bzw. das 54'000 X g-Sediment (suspendiert in 10 ml Puffer) wurde mit 0,3% Digitonin (w/v) versetzt, 10 min bei 4 °C gerührt, anschliessend bei 4000 X g (5 min)

und dann 54'000 X g (10 min, Beckman T-50 Rotor) zentrifugiert. Aliquote des 54'000 X g-Ueberstandes wurden auf einen 5-20% Saccharose-Dichtegradienten (vgl. oben) geschichtet und bei 185'000 X g zentrifugiert (7,5 h). Anschliessend wurde die Chitinsynthetase-Aktivität in den 0,5 ml-Fraktionen bestimmt.

2.5. Dissoziation und Rekonstitution von Chitosomen

Zur 'Solubilisierung' der chitosomalen Chitinsynthetase wurden Peakfraktionen (total 7 ml) des Gradienten einer Chitosomenpräparation auf 36 ml verdünnt und bei 104'000 X g zentrifugiert (4 h, SW-28 Rotor). Das Sediment, suspendiert in 4 ml 0,1% Digitonin (Protein : Saponin-Verhältnis = 1,4-1,6), rührte man langsam während 12 h bei 4 °C. Aliquote von 0,7 ml wurden auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten (5-20% : 9,6 ml mit einem Kissen von 1,2 ml 50% Saccharose) aufgetragen, während 7,5 h zentrifugiert (150'000 X g, SW-41 Ti-Rotor) und auf die Chitinsynthetase-Aktivität in 0,5 ml Fraktionen geprüft.

Zur Rekonstitution von Chitosomen wurden chitosomale Untereinheiten aus 6 Gradienten (total 9 ml) gepoolt und die Probe auf 36 ml verdünnt, Portionen von 6 ml in einem T-50 Rotor zentrifugiert (155'000 X g, 5,25 h) und alle Sedimente in 1 ml Puffer vereinigt. Ein Aliquot von 0,8 ml wurde auf einen 5-35% linearen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet, während 3 h bei 110'000 X g zentrifugiert (SW-41 Ti-Rotor) und in 0,5 ml Fraktionen aufgetrennt.

2.6. Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten von Chitinsynthetasepartikeln

Pools (je 3 ml) chitosomaler Chitinsynthetase, bestehend aus den Fraktionen 5-7, 10-12 und 15-17 ('leichte', Peakfraktion-Chitosomen bzw. 'schwere' Chitosomen) aus dem hyperbolischen 5-50% Saccharose-Dichtegradienten (vgl. Fig. 9) wurden je auf 0,5 ml konzentriert (Amicon-Ultrafiltrationseinheit, Membran XM-300). Der $s_{20,w}$ -Wert der Peakfraktion-Chitosomen (Proteinkonzentration 3 mg/ml) wurde dann mittels einer analytischen Ultrazentrifuge, bestückt mit einer Schlieren-Optik, bei 20'000 rpm und 4 °C bestimmt.

Zur Berechnung des Sedimentationskoeffizienten diente die folgende Gleichung :

$$s_{20,w} = s_{t,LM} \cdot \frac{\eta_{t,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{t,Lsg}}{\eta_{t,w}} \cdot \frac{(1 - v_{20,w} \cdot \rho_{20,w})}{(1 - v_{t,LM} \cdot \rho_{t,Lsg})}$$

wobei :	$\eta_{t,w}$	= 1,567	cp
	$\eta_{20,w}$	= 1,002	cp
	$\eta_{5\text{ °C},Lsg}$	= 1,603	cp
	$v_{5\text{ °C},Lsg}$	= 0,72	ml/g
	$\rho_{t,Lsg}$	= 1,0082	
	LM	= Lösungsmittel	

'Leichte' und 'schwere' Chitosomen wurden in einem 5-35% linearen Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert. Durch Vergleich mit dem Sedimentationsverhalten der chitosomalen Peakfraktion auf einem identischen Gradienten konnten anhand der mittels Computer errechneten Tabellen von McEwen (1967) die S-Werte dieser beiden Fraktionen ermittelt werden. Die Bestimmung des S-Wertes der chitosomalen Untereinheiten erfolgte durch Zentrifugation in einen 5-20% linearen Saccharose-Dichtegradienten; als Referenz diente β -Galaktosidase (S = 16 : Handbook of Biochemistry, 2nd, ed. 1970).

3. Chemische Analyse der Hyphenwand

3.1. Isolation gereinigter Wandfragmente

3.1.1. Mechanische Fragmentierung des Mycels

Die Trennung des Mycels vom Kulturmedium erfolgte auf einer Glasfilternutsche (G4). Der Mycelkuchen wurde mit H₂O gewaschen und in Streifen geschnitten. Starkes Mörsern unter flüssigem N₂ führte zu einem feinen Pulver, welches, in wenig H₂O aufgenommen, in eine X-Press (LKB-Schweden) eingefüllt und während 6 h bei -19 °C gehalten wurde. Zweimaliges Durchpressen bei 12 atm ergab einen guten Aufschluss, wenn das Pulver zwischen den beiden Pressvorgängen vollständig aufgetaut und wieder eingefroren wurde.

3.1.2. Reinigung

Die aufgetauten Mycelfragmente wurden mit 200 ml 1 M NaCl versetzt und die Proben während 5 min im Kühlraum gerührt. Die Sedimentation der Mycelfragmente erfolgte während 8 min bei 1100 X g (Christ UJ III E). Dieser Waschvorgang wurde 6-8 Mal wiederholt, bis der resultierende Ueberstand vollständig klar war. Nachfolgend wurde das von Michalenko et al. (1976) modifizierte Reinigungsverfahren nach Mitchell & Taylor (1969), das aus den im folgenden genannten Schritten besteht, angewendet. Nach jeder Zentrifugation wurde das Sediment jeweils wieder homogen aufgeschlämmt :

- (1) mit 1 M Harnstoff behandeln (20 min) und zentrifugieren
- (2) mit 200 ml H₂O waschen und zentrifugieren; Vorgang
2x repetieren
- (3) mit 1 M NH₄OH behandeln (5 min) und zentrifugieren
- (4) mit 200 ml H₂O waschen und zentrifugieren; Vorgang
1x wiederholen

- (5) mit 2% HCOOH behandeln (5 min), zentrifugieren
- (6) wie (4)
- (7) durch Ultrafiltration mit einer 50 ml Amicon-Zelle UM 20 (4 atm Ueberdruck, 10facher Volumenaustausch) deionisieren und auf ca. 30 ml konzentrieren
- (8) lyophilisieren (Christ-Gefriertrocknungsanlage)

3.2. Fraktionierung des Wandmaterials

Alle Reaktionen wurden in dickwandigen Reagensgläsern (17 x 104 mm) durchgeführt. Die Zentrifugationen erfolgten bei 6200 X g während 10 min (Christ UJ III E).
Fraktionierungsschema (nach Wessels et al. 1972) :

50 mg lyophilisierte Wände

mit 5 ml H₂O rehydratisieren (10 min)
extrahieren (100 °C, 10 min)

Ueberstand WG

Sediment

mit 5 ml 1 N KOH extrahieren
(60 °C, 20 min)

Ueberstand S1

Sediment

mit 5 ml 1 N KOH extrahieren
(60 °C, 20 min)

Ueberstand S2

Sediment

+ 2,5 ml H₂O

Ueberstand S3

Sediment

mit 5 ml 0,5 N HCl extrahieren
(100 °C, 60 min)

Ueberstand R1

Sediment

mit 5 ml 1 N KOH extrahieren
(60 °C, 20 min)

Ueberstand R2

Sediment

+ 2,5 ml H₂O

Ueberstand R3

Sediment

3x mit H₂O
waschen

lyophilisieren

Nach Vereinigung der Ueberstände S1, S2 und S3 wurde das pH mit HOAc auf 5,0 eingestellt und nach 12 h bei 4 °C präzipitiertes S-Glucan bei 6200 X g sedimentiert sowie mit H₂O gewaschen. Alle Fraktionen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei - 19 °C aufbewahrt.

3.3. Analyse einzelner Wandfraktionen

3.3.1. Bestimmung N-freier-Polysaccharide mit dem Anthron-Reagens

Die ursprünglich von Dreywood (1946) beschriebene, von Morris (1948) und Fairbairn (1953) weiterentwickelte Methode basiert auf der Kondensation eines Zuckermoleküls mit 2 oder 3 Anthron-Molekülen (vgl. Momose et al., 1957), was zur Bildung eines farbigen Produktes mit $\lambda_{\text{max}} = 619 \text{ nm}$ führt.

Die Proben (je 3fach) gelangten im Falle der R1-bzw. R2-Fraktion mit einer Verdünnung von 100 resp. 20 zur Analyse; das in 50 ml KOH aufgenommene S-Glucan sowie die Fraktionen WG und R3 wurden hingegen direkt verwendet.

Die Analyse erfolgte nach diesem Schema :

- (1) die Probe (1 ml) mit 5 ml Anthron-Reagens (1 g Anthron in 240 ml H_2O und 760 ml konz. H_2SO_4) versetzen
- (2) genau 9 min im Wasserbad kochen
- (3) Reaktion im Eisbad stoppen
- (4) A_{619} bestimmen (Spectronic 21). Als Standard diente eine Glucoselösung (0,01%; w/v).

Glucosamin·HCl, N-Acetyl-glucosamin und Mannit erwiesen sich als Anthron-negativ. Zur Ermittlung eines Korrekturfaktors bei der Anwendung dieser Methode auf α -1,3- und β -1,3-Glucane wurden je 10 mg Glucose, Nigeran und Laminarin (über P_4O_{10} getrocknet) in 3 ml 0,5 N HCl während 1 h bei 100 °C inkubiert. Die Trennung hierbei nicht gelöster Substanz von den Hydrolyseprodukten erfolgte durch Zentrifugation bei 10'000 X g auf einer Sorvall RC-5. Zur Kohlenhydrat-Bestimmung an Aliquoten aus dem Ueberstand diente die Anthronmethode (s. oben).

Unter Berücksichtigung der hier bestimmten Methoden-genauigkeit von $\pm 2\%$ war die Ausbeute bei Nigeran 92% und bei Laminarin 95%. Glucose selbst konnte unter diesen Bedingungen zu 100% wieder nachgewiesen werden.

3.3.2. Bestimmung des Chitins

Der hier verwendete Glucosamin-Test – von Elson & Morgan (1933) entwickelt und von Tracey (1955) und Johnson (1971) modifiziert – wurde nach dem folgenden Verfahren durchgeführt :

- (1) Alle Proben mit H_2O auf 1 ml ergänzen
- (2) nach Addition von 1 ml Acetyl-Aceton-Reagens (4% Acetyl-Aceton in 1,5 M Na_2CO_3) 30 min im siedenden Wasserbad kochen
- (3) Reaktion im Eisbad stoppen

- (4) 5 ml Aethanol abs. und 1 ml Ehrlich-Reagens (2,67% p-Dimethylaminobenzaldehyd in konz. HCl : Aethanol abs. = 1:1) hinzufügen und die Proben gut mischen
- (5) Nach 30 min die Extinktion bei 529 nm bestimmen (Spectronic 21). Als Standard diene Glucosamin·HCl (5 mg/100 ml H₂O).

Durch die folgende Modifikation des Glucosamin-Tests (Tracey, 1955) kann direkt N-Acetyl-glucosamin bestimmt werden :

- (1) Proben mit H₂O auf 1 ml ergänzen
- (2) 0,3 ml gesättigte Na-Borat-Lösung zugeben und das Reaktionsgemisch in verschlossenen Sovirell-Röhrchen während 7 min kochen
- (3) Reaktion im Eiswasser abstoppen
- (4) 8,7 ml Eisessig und 1 ml modifiziertes Ehrlich-Reagens (1 g Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ml Eisessig + 2,5 ml konz. HCl) hinzufügen und die Ansätze gut mischen
- (5) Nach 30 min die Extinktion bei 529 nm bestimmen. Als Standard diene eine 0,01%ige Lösung von über P₄O₁₀ getrocknetem N-Acetyl-glucosamin.

Der Hydrolysenverlust von Chitin setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, nämlich (1) Ringspaltung des Glucosamins, (2) unvollständiger Polymerspaltung und (3) Bildung von Kohlenhydrat-Protein-Komplexen, sog. Humin-Präzipitaten (Martin, 1945; James, 1972). Die durch das Hydrolyseverfahren auftretenden Verluste an Chitin wurden folgendermassen ermittelt (vgl. auch Texte zu Abb. 2 und 3) : je 5 mg Glucosamin·HCl, Crustaceen-Chitin bzw. lyophilisierte Chitin-Fraktion aus *A. bisporus* wurde in 3 ml 6 N HCl bei 115 °C in einem Dampfkochtopf (Kuhn-Duromatic) hydrolysiert und die HCl im Rotationsverdampfer bei 45 °C entfernt. Als Referenz diene Glucosamin·HCl (0,005%, v/w).

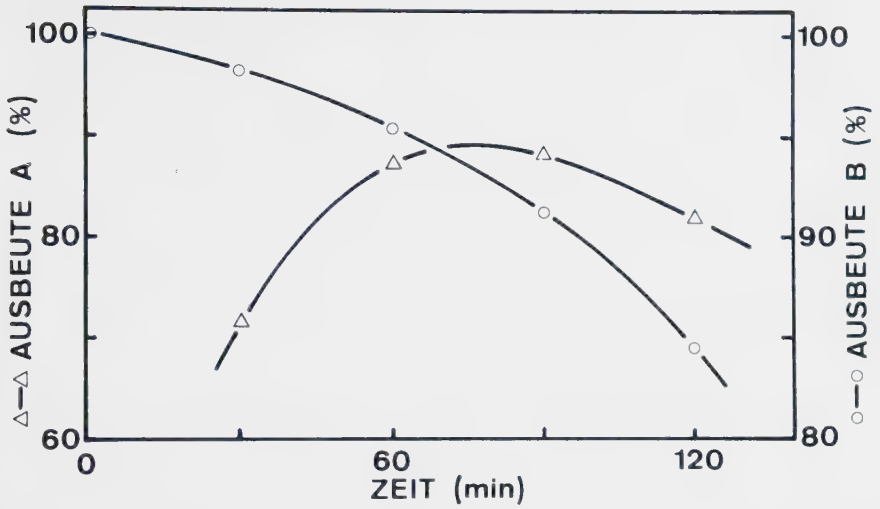


Abb. 2 : Ausbeute an Glucosamin bei der Hydrolyse von Crustaceen-Chitin (A) und der Destruktion von Glucosamin·HCl (B) in 6 N HCl (115 °C, N₂-Atmosphäre).

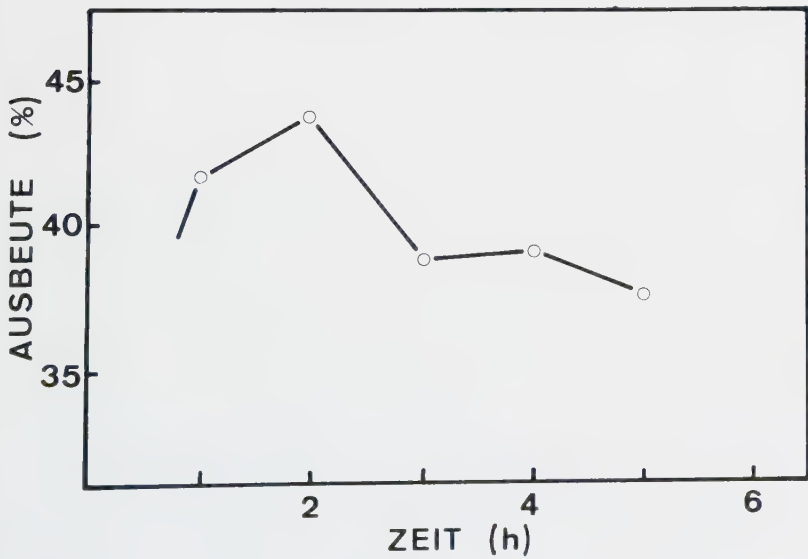


Abb. 3 : Ausbeute an Glucosamin bei der Hydrolyse des Chitin-Komplexes von *A. bisporus* in 6 N HCl (115 °C, unter N₂).

Abb. 3 zeigt, dass die maximale Ausbeute bei einer Hydrolysedauer von 2 h erreicht wird, was mit der Glucosamin-Freisetzung bei der Hydrolyse des Myceliums von *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporoides* und *Fusarium moniliforme* übereinstimmt (Cochran & Vercelloti, 1978). Hyaluronsäure, Chondroitin-Sulfat und Heparin ergaben ähnliche Hydrolyseoptima (Swann & Balazs, 1966).

Die in Abb. 3 erreichte maximale Ausbeute entspricht 43% der eingewogenen Menge. Der nicht erfasste Rest setzt sich zusammen aus der Glucosamin-Destruktion (16%, vgl. Abb. 2), unvollständiger Hydrolyse (unter Berücksichtigung der gleichzeitig erfolgenden Glucosamindestruktion 6%, s. Abb. 2), dem Gehalt an nicht N-haltigen Kohlenhydraten (11%; s. Tab. 1) sowie dem Humin-Präzipitat (gewogen) und unbekannten Verlusten (als Differenz berechnet: 24%). Daraus ergibt sich ein Korrekturfaktor von 2,32 zur Berechnung des Gesamtchitingehaltes, welcher bei den in der Tabelle 1 angegebenen Werten berücksichtigt worden ist.

4. Analyse von Lipiden

4.1. Extraktion der Lipidfraktion

Chitinsynthetase-Präparationen (Fraktionen 7-18 des 5-50% Saccharose-Dichtegradienten; vgl. Abb. 9a) wurden mit H₂O auf 150 ml verdünnt, die Chitosomen sedimentiert (Rotor SW-28; 4 h, 104'000 X g), die Sedimente je in 2 ml H₂O homogen aufgenommen, vereinigt und lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Christ-Delta I). Die Extraktion der Lipide erfolgte mit CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) bei einem Lösungsmittel : Trockensubstanz-Verhältnis von 85 : 1 (v/w) während 1 h bei 40 °C. Nach der Abtrennung des Rückstandes mittels Filtration durch ein Glasfaserfilter (Whatman GF/A) wurde das Extraktionsprozedere wiederholt. Die vereinigten Extrakte wurden mit N₂ zur Trockene eingeengt, in 5 ml CHCl₃ aufgenommen und 2x mit 2ml

H₂O dest. gewaschen. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische bei 5 °C mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet (12 h). Das Na₂SO₄ entfernte man mittels Filtration, und das Lösungsmittel evaporierte man unter einem N₂-Strom.

4.2. Separation und Identifikation von Komponenten

Die Auftrennung der neutralen resp. der polaren Lipide erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Platten (Merck 60; 20 x 20 cm; 250 µm Schichtdicke; während 1 h bei 150 °C aktiviert). Als Fliessmittel dienten Pentan : Diäthyläther : Essigsäure (75:20:1 = System I) resp. Hexan : Diäthyläther : Essigsäure (79:20:4 = System II). Die Lipide wurden im Jod-Dampf sowie durch Besprühen mit Schwefelsäure (20%, bei 120 °C) sichtbar gemacht. Die Separation des Total-extrakts in eine Kohlenwasserstoff-Fraktion sowie in die neutrale bzw. polare Fraktion erfolgte auf einer Silicagel-Säule (60-120 mesh, 5 cm x 6 mm), die nacheinander mit 2% Diäthyläther in Pentan, Benzol und Methanol eluiert wurde. Zweidimensionale DC auf Silicagel-Platten (vgl. oben) mit Chloroform : Aceton : Methanol : Essigsäure : Wasser (30:40:10:10:5 = System III), gefolgt von Chloroform : Methanol : 25% NH₄OH (65:26:5 = System IV), diente zur Auftrennung der Phospholipide. Die Identifikation der einzelnen Substanzen erfolgte mittels Co-Chromatographie von authentischen Standards. Eine Bestätigung der Identität von Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin konnte durch positive Tests mit Ninhydrin, für Phosphatidylcholin mit Dragendorff's Reagens (Kates 1972) erhalten werden. Als Test für Glycolipide (mit Galactosyldiacylglycerin als Referenz) wurde Orcinol (100 mg/ 50 ml 75% H₂SO₄) verwendet.

Die Phosphorbestimmung erfolgte photometrisch nach der Methode von Barlett (1959). Der Gehalt an freiem Sterol wurde nach Liebermann-Burchard (Starr & Parks 1962), jedoch bei 659 nm bestimmt.

5. Gaschromatographie

5.1. Analyse von Luft aus Kulturgefäßen

Die Probenentnahme (30 ml) erfolgte mit einer gasdichten Spritze (Hamilton) durch einen fest montierten Sterilfilter, die Bestimmung der CO₂-Konzentration mit einem Varian-Aerograph 1400.

Chromatographierbedingungen :

Kolonne 1 : Porapak Q (80/100 U.S. mesh) 5,5 m,
80 °C isotherm

Kolonne 2 : Molekular-Sieb 5 Å (30/50 U.S. mesh) 5,5 m,
25 °C isotherm

Trärgas : He, 27 ml/min

Detektor : WLD, 110 °C, 250 mA, Verstärkung : variabel

Standard : Eichgas 1000 ppm CO₂

Diese Kolonnen-Anordnung ermöglicht neben der CO₂-Bestimmung auch die quantitative Erfassung von O₂ und N₂.

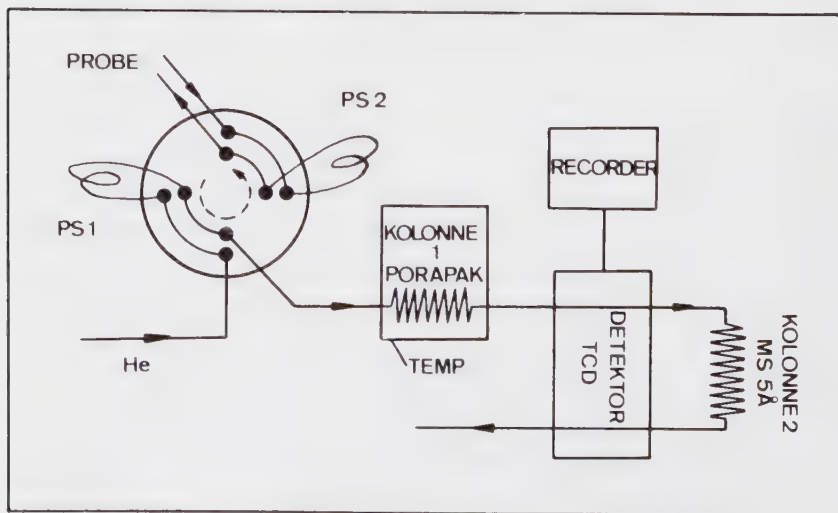


Abb. 4 : Schematische Darstellung des zur Gasanalyse verwendeten Chromatographie-Systems. Kolonne 1 : Trennung CO_2 /Luft, Kolonne 2 : Trennung N_2/O_2 .

5.2. Analyse von Fettsäuren

Fettsäuren wurden in Form ihrer Methylester analysiert. Deren Herstellung erfolgte durch Transmethylierung mit 3% Natriummethoxid in Methanol im Wasserbad (75°C), gefolgt von 3maligem Waschen mit Diäthyläther. Die über Nacht mit Na_2SO_4 getrocknete Aetherphase wurde filtriert und unter einem N_2 -Strom zur Trockene gebracht. Eine weitere Reinigung der Methylester konnte durch Säulenchromatographie (Sili-cagel: vgl. oben; Elutionsmittel : Benzol) erzielt werden.

Die Analyse der Methylester erfolgte mit Kapillarsäulen (Silar 10, 20m, resp. SP-2340, 30 m) auf einem Carlo Erba resp. Hewlett-Packard Gaschromatographen (5010A) welcher an einen HP-Integrator angeschlossen war. Der Eingangsdruck des Trägergases war 1 kg/cm^2 , das Split-Verhältnis 150:1. Die Injektor- bzw. Detektortemperatur betrug 250°C bzw. 300°C , die Ofentemperatur war programmiert (140 bis 210°C ; 3°C/min). Sterole wurden auf einer SE-30 (30 m) Glaskapillarsäule bei 240°C isotherm getrennt.

6. Elektronenmikroskopie

Zur Negativkontrastierung der Chitosomen wurde die Methode von Bracker et al. (1976) leicht modifiziert übernommen. Tropfen von Enzympräparationen (vgl. II/2.1.) wurden auf kohlebedampfte Formvarfilme auf Kupfernetzchen (400 mesh) aufgetragen, während 5-20 min inkubiert (nur bei Fibrillogenese) und in einem Tropfen Glutaraldehyd (2% in 0,1 M Na-Kakodylat-Puffer, pH 7,1) während 1 min fixiert. Nach 2maligem Waschen mit H_2O wurde während 15 s in wässrigem Uranylacetat (2%) kontrastiert und dann überschüssiges Kontrastierungsmittel mit einem Filterpapier entfernt. Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem Hitachi HS-8 bei 50 kV.

7. Röntgendiffraktometrie

Gemörserte Proben wurden zu 0,5 mm dicken Rondellen gepresst und einem Ni-gefilterten CuK_α -Röntgenstrahl ausgesetzt (Philips Röntgen-Röhre 38 kV/23 mA).

Die Aufzeichnung des Röntgendiagramms erfolgte im Abstand von 40 mm auf einen Kodak-Kodirex Flachfilm. Die Filme wurden auf einem Joyce-Mikrodensitometer radial abgefahren und das Beugungsmuster in ein zweidimensionales Diagramm übertragen.

8. Varia

Zum Nachweis der β -Galaktosidase diente das folgende Verfahren : 100 μl Aliquote wurden mit 2 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,0 und 0,2 ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG, 10 mg/ml) versetzt. Nach Zugabe von 2 ml 2% NaCO_3 wurde A_{420} gemessen. Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976), mit Serumalbumin als Standard, bestimmt; das in einigen Proben vorhandene Digitonin hatte – in den verwendeten Konzentrationen – keinen Einfluss auf die Proteinbestimmung. Digitoninlösungen wurden kurz vor Gebrauch durch Erhitzen in dest. H_2O hergestellt. Die Aufnahme des IR-Spektrums von α -Glucanen (in KBr-Presslingen; 0,5%) erfolgte mit einem Perkin-Elmer 157 Spektrophotometer.

9. Herkunft spezieller Chemikalien

UDPGlcNAc	Sigma (St. Louis, MO)
Digitonin	
α -Tomatin	
saure Protease (aus <i>Aspergillus saitoi</i>)	
Trypsin	
ONPG	
β -Galaktosidase	
Chitinase	

Pronase	Calbiochem (La Jolla, CA)
RNase (ex Pankreas, 5x krist.)	
Crustaceen-Chitin	
Laminarin	Koch-Light (Colnbrook, GB)
Nigeran	
Amphotericin B-methylester	Squibb (Princeton, N.J.) (Geschenk)
Nikkomycin X,Z	Prof. Zähler, Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen (BRD) (Geschenk)
Rennilase	Schweizerische Ferment AG Basel (Geschenk)
UDP- [^{14}C]-GlcNAc	ICN (Irvine, CA)
p-Dimethylaminobenz- aldehyd	Merck (Darmstadt, BRD)
Eichgas : 1000 ppm CO ₂ in He	Applied Science, Technosa, (Lausanne)
Porapak Q (80/100 U.S. mesh)	
Molekular-Sieb 5 Å (30/50 U.S. mesh)	
9,10-Dihydro-9-oxo-anthrazen (Anthron)	Fluka (Buchs, SG)
GC-Säulen: SP 2340	Supelco (Bellefonte, PA)
Silar 10	Applied Science, Technosa, (Lausanne)
SE-30	Jaeggi H & G AG, Trogen (Schweiz)
Saponin aus <i>Digitalis lanata</i>	Extraktion aus Blättern von <i>Digitalis lanata</i> nach Tschesche & Wulff (1973)

III. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

A. SUBMERSKULTUR VON CHAMPIGNONMYCELIUM

Um beim Experimentalobjekt zur Isolation von Wandfragmenten und von Chitinsynthetase eine Differenzierung des Myceliums (z.B. in Luft- und Substrathyphen) zu verhindern und damit grösstmögliche Homogenität und Reproduzierbarkeit des Versuchsmaterials zu gewährleisten, wurde eine Submerskultur verwendet. Die bei dieser Technik oft angewendete Schüttelkultur führt bei *Agaricus* aber häufig zur Bildung von Pellets – makroskopischen, harten Mycelkugeln, die eine ausgesprochene Tendenz zur Autolyse in den zentral gelegenen Hyphen aufweisen –, wodurch die Homogenität des Materials wiederum in Frage gestellt wird. Die besten Resultate wurden mit einer mittels Teflon-Magnetrührstab bewegten Flüssigkultur erreicht. Die in Tab. 1 aufgeführten Werte bestätigen, dass diese Kultivationsart die geforderte Reproduzierbarkeit in hohem Masse gewährleistet. Aus der Messung des Trockengewichtes als Funktion der Zeit (Abb. 5) resultierte nicht nur eine typische Wachstumskurve, sondern auch eine Parallelität im Verlauf der Biomassezunahme mit dem CO₂-Ausstoss in die Atmosphäre. Dies ist ein weiterer Beweis für die Homogenität der Kultur. Schliesslich waren auch die Aktivitäten der Chitinsynthetase-Präparationen sehr gut reproduzierbar; sie betrugen jeweils ca. 360 U (bezogen auf den Bio-Gel-Pool = 20 ml).

Diese Kultivationsart erwies sich auch deshalb als besonders günstig, weil mit einem vollsynthetischen Medium und NH₄⁺ als N-Quelle zur zusätzlichen Erhöhung der Reproduzierbarkeit und der Manipulation der Wachstumsraten gearbeitet werden kann, wodurch sich insbesondere auch eine elegante Möglichkeit für spätere Untersuchungen zur Beeinflussung der Chitinsynthetase in vivo durch exogene Agentien eröffnet.

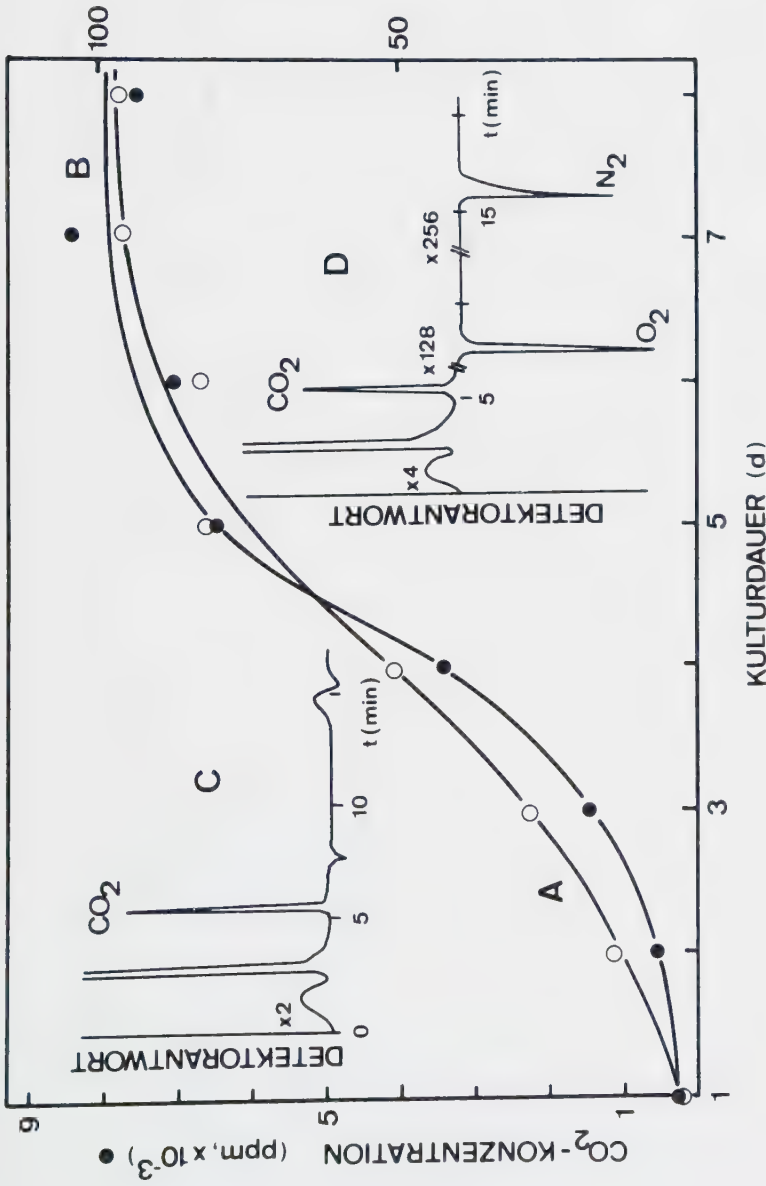


Abb. 5 : Zeitlicher Verlauf der Biomasseproduktion (A) und der CO₂-Konzentration (B) in der Atmosphäre einer Submerskultur von *A. bisporus*, das Eichchromatogramm 1000 ppm CO₂ in He (C) sowie das Chromatogramm einer Gasprobe aus einem Kulturgefäß nach einer Inkubationszeit von 3 d (D).

B. ZUSAMMENSETZUNG DER MYCELIALEN ZELLWAND VON *A. BISPORUS*

1. Quantitierung der wichtigsten Wandfraktionen

Die quantitativen Anteile der einzelnen Polysaccharidfraktionen an der Wandtrockensubstanz von in Submerskultur gezogenem Champignonmycelium sind in Tab. 1 aufgeführt. Darnach stellen Chitin und R-Glucan mit ca. 29 resp. 24% die Hauptkomponenten dar. Der Gehalt an S-Glucan beträgt ca. 9%. Dass der Anteil von heisswasserlöslichem Glucan, bei welchem es sich um einen Schleim, und zwar um ein β -1,3 (β -1,6)-Glucan, handeln dürfte (vgl. Diskussion), lediglich 0,5% beträgt, ist angesichts der rigorosen Waschmethode zur Reinigung der Wände nicht erstaunlich. Wie der Tabelle 1 weiter zu entnehmen ist, tragen die hier analysierten Fraktionen ca. 65% zum Totalgewicht der Wand bei.

2. Detailanalyse einzelner Wandfraktionen

2.1. S-Glucan (α -1,3-Glucan)

Das von Wessels et al. (1972) aus *S. commune* isolierte KOH-lösliche, mit Hilfe der Totalmethylierung als α -1,3-Glucan identifizierte S-Glucan ist, wie die Abbildungen 6 und 7 zeigen, dem S-Glucan aus *A. bisporus* sehr ähnlich.

TABELLE 1

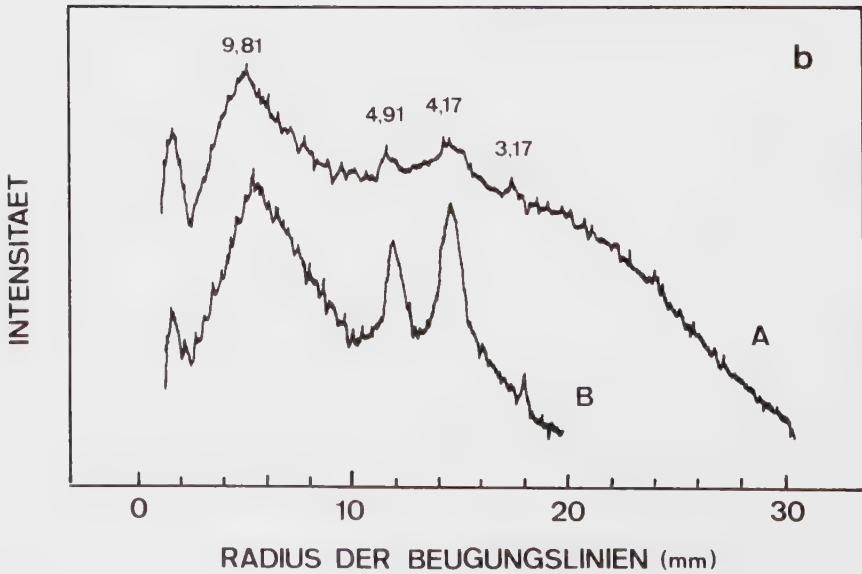
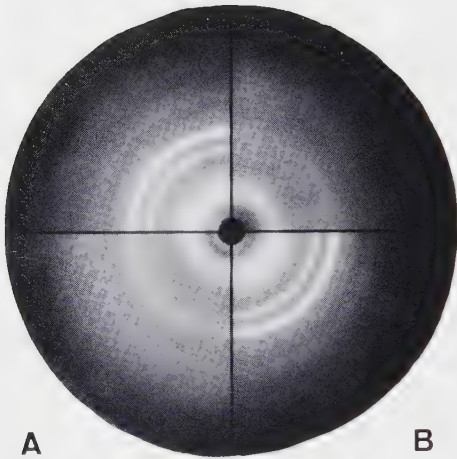
Quantitierung der wichtigsten Fraktionen der mycelialen Hyphenwand von *A. bisporus*

FRAKTION	GEHALT	
	mg*	%**
HEISSWASSER-EXTRAKT	0,24 ± 0,02	0,47 ± 0,04
S-GLUCAN	4,44 ± 0,38	8,88 ± 0,74
R1***	9,6 ± 1,06	19,21 ± 2,11
R2***	2,15 ± 0,30	4,3 ± 0,62
R1+R2	11,75 ± 1,36	23,51 ± 2,73
CHITIN	14,29 ± 1,9	28,57 ± 3,8
N-FREIES GLUCAN (R3) IM CHITINKOMPLEX***	1,56 ± 0,28	10,9 ± 2

- * Bei Einwaage von 50 mg des gereinigten, lyophilisierten Wandmaterials (vgl. II/3).
- ** Die Werte sind auf das Trockengewicht des Ausgangsmaterials (Wände) bezogen; bei deren Berechnung ist ein Korrekturfaktor von 0,97 für das S-Glucan, 0,95 für das R-Glucan (R1+R2+R3) sowie den Heisswasserextrakt und 2,32 für den Chitin-Komplex (wegen methodisch bedingter Verluste) berücksichtigt worden (s. II/3).
- *** Vgl. Abschnitt II/3.

a

Abb. 6. Vergleich des S-Glucans aus *A. bisporus* (A) mit dem α -1,3-Glucan aus *S. commune* (B) mittels Röntgendiffraktometrie. (a) Pulverdiagramm, (b) densitographische Auswertung des Röntgenfilms (d-Werte aus Wessels et al. 1972).



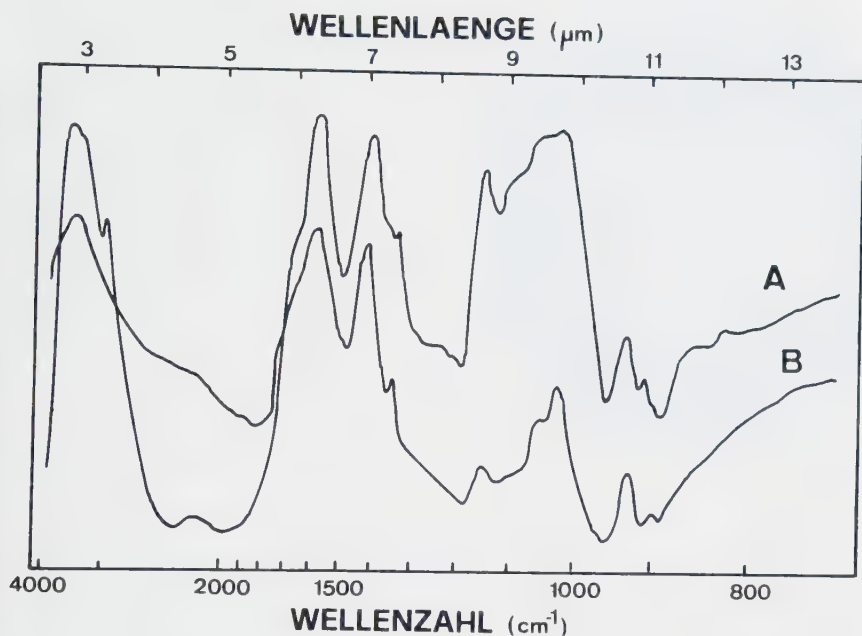


Abb. 7 : IR-Spektrum des aus Hyphenwänden von *A. bisporus* isolierten S-Glucans (A) resp. des α -1,3-Glucans aus Mycelwänden von *S. commune* (B).

2.2. Chitin-Fraktion

Ein beträchtlicher Teil – ca. 30% (vgl. Tab. 1) – der Hyphenwand erwies sich als KOH- und HCl-unlöslich. Die röntgen-diffraktometrische Analyse (vgl. Abb. 8) zeigt, dass es sich hierbei erwartungsgemäss um die Chitinfraktion handelt. Ein Vergleich mit den bei Chitin aus Crustaceen (Jelsma 1979) sowie *Saccharomyces cerevisiae* (von Beran et al. (1972) und Muzzarelli (1977) als α -Form bezeichnet) und *A. bisporus* gefundenen d-Werten zeigt zudem Gleichheit in der Kristallstruktur auf.

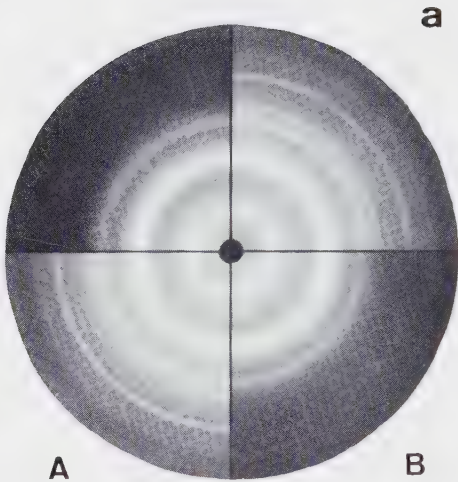
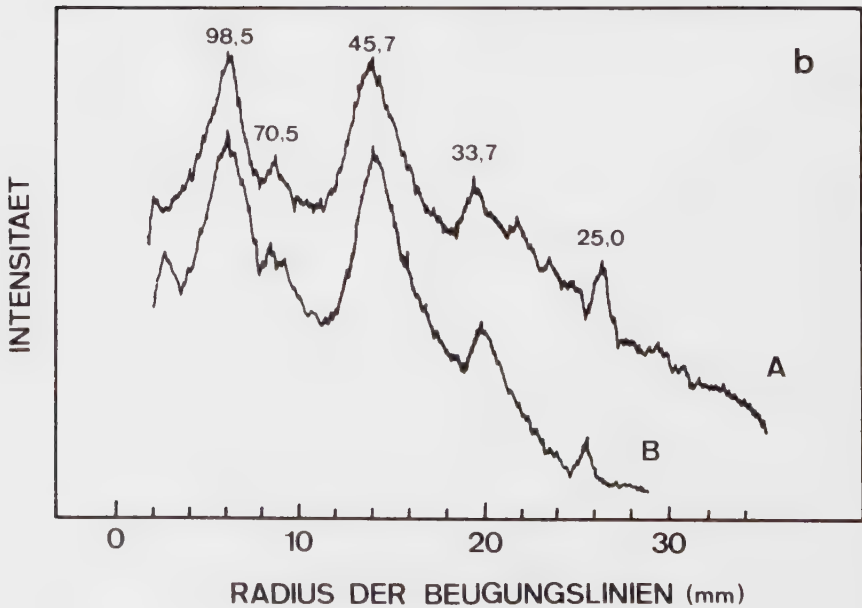


Abb. 8 : Röntgendiffrakto-
gramm des Chitin-
Komplexes aus *A. bi-*
sporus (A) und von
Crustaceen-Chitin (B).
(a) Pulverdiagramm,
(b) Densitographische
Auswertung des Röntgen-
films (d-Werte aus Ver-
meulen et al. 1979).



Im Unterschied zum chemisch isolierten Chitin zeigten unfraktionierte Wände nur schwache Diffraktionsbanden (für eine Interpretation vgl. Diskussion). Wie aus Tab. 1 hervorgeht, enthält der Chitin-Komplex auch zu ca. 11% N-freies Polysaccharid. Dabei dürfte es sich, da eine Suszeptibilität der interessierenden Substanz auf β -Glucanasen nachgewiesen werden konnte (Hänseler 1980), um ein β -Glucan handeln.

C. IN VITRO-SYNTHESE VON CHITIN UND DEREN BEEINFLUSSUNG DURCH ANTIBIOTIKA

1. Isolation von chitosomaler Chitinsynthetase aus Champignonmycelium

1.1. Reinigung und Bestimmung der ultrastrukturellen Charakteristika der chitosomalen Chitinsynthetase

Unter Verwendung des von Bartnicki-Garcia et al. (1978) beschriebenen, hauptsächlich an *M. rouxii*-Hefezellen ausgearbeiteten Verfahrens zur Extraktion und Isolation von Chitosomen, welches differentielle Zentrifugation, Gel-Chromatographie und Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten umfasst (vgl. Methoden), wurden die in Abb. 9 und Tab. 2 zusammengefassten Resultate erhalten. Sie zeigen, dass das aus *A. bisporus* isolierte Enzym demjenigen von *M. rouxii* sehr ähnlich ist, verhält es sich doch im Dichtegradienten als eine homogene Population, und steigen doch sowohl die totale als auch die spezifische Aktivität bei der Permeationschromatographie an und weist der Chitosomenpool eine spezifische Aktivität von 40-50 auf.

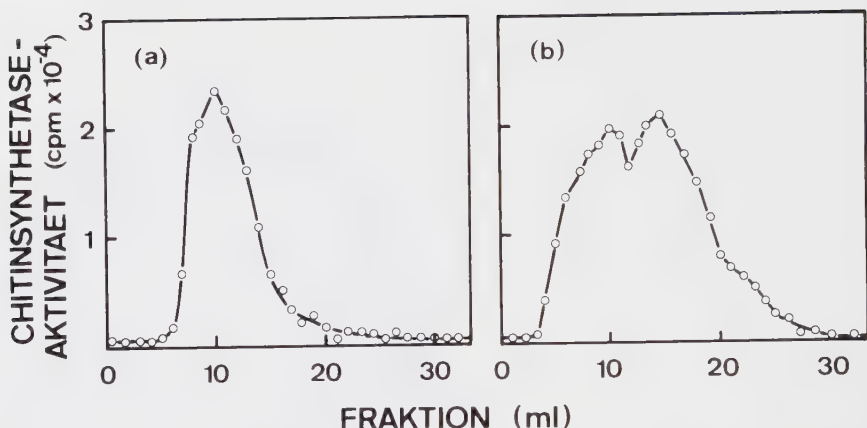


Abb. 9 : Fraktionierungsprofil des Dichtegradienten einer chitosomalen Chitinsynthetase-Präparation aus Mycelium von *A. bisporus*. (a) Isolation nach Bartnicki-Garcia et al. (1978); (b) wie (a), aber eine Inkubation des mycelialen Homogenates in 0,3% Digitonin beinhaltend.

Nicht nur biochemisch, sondern auch ultrastrukturell besteht eine grundlegende Übereinstimmung zwischen dem hier untersuchten Enzym und der chitosomalen Chitinsynthetase von *M. rouxii* sowie von anderen Pilzen (vgl. Abb. 10 und 11 sowie Bartnicki-Garcia et al. 1978). Das Gros der Chitosomen hatte einen Durchmesser von 50-90 nm. Neben einigen nicht identifizierten Komponenten enthielt die Chitosomenpräparation auch Partikel, die von Bracker et al. (1976) als Fettsäuresynthetase bzw. als durch die RNase Behandlung nicht verdaute Ribosomen bezeichnet wurden. Zusätzlich zu cycloiden und proctoiden Chitosomen (Abb. 10 : a,c,d), mit kontrastierten resp. nicht kontrastierten inneren Strukturen, konnten immer auch sphäroide Partikel derselben Grösse, die aber vom Kontrastierungsmittel nicht durchdrungen waren, beobachtet werden, ebenso wie intermediäre Formen zwischen proctoiden und cycloiden Chitosomen, welche einen runden Körper (ca. 30 nm) enthielten.

TABELLE 2

Reinigung der Chitinsynthetase aus Mycelium von *A. bisporus*. Das Prozedere umfasst differentielle Zentrifugation (4000 X g, 54'000 X g), Permeationschromatographie (Bio-Gel A-5m), Ultrafiltration (Amicon) und eine Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten (5-50%).

Fraktion	Protein		Chitinsynthetase-Aktivität		
	mg	%	total cpm	spezifisch %	spezifisch U · mg ⁻¹
4000g-Ueberstand	239.9	100	110860	100	1.3
54'000g-Ueberstand	154.3	64.3	62000	55.9	1.1
Bio-Gel A-5m	24.3	10.1	103360	93.2	11.8
Amicon-Konzentrat	9.4	3.9	17390	15.7	5.2
Chitosomen-Pool	1.6	0.7	30240	27.3	50.0

Wurden Chitosomen mit Substrat (UDPGlcNAc) und Aktivatoren (Pronase, GlcNAc, Mg²⁺) inkubiert, so synthetisierten sie Chitinmikrofibrillen; die meisten wiesen eine Dicke von 5-10 nm auf. Hierbei öffnete sich oft die Schale, z.T. unter Zerfall in kleinere Strukturen. Das Auftreten von fibrillären Partikeln, sog. 'fibroids' (Bracker et al. 1976), die Kontinuität mit einer Mikrofibrille aufweisen, ist häufig. Solche 'Chitinknäuel' können sowohl innerhalb als auch ausserhalb aufgebrochener Chitosomenschalen vorkommen (Abb. 11 : b,c,e). Einige der noch intakten Chitosomen enthielten eine runde Partikel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm (Abb. 11 : a,d; vgl. auch Abb. 10e).

Zugabe von Digitonin zum mycelialen Homogenat erhöhte sowohl die Proteinkonzentration als auch die Chitinsynthetase-Aktivität im 54'000 X g-Ueberstand (Abb. 12). Der diesem Digitonineffekt zugrunde liegende Mechanismus ist zweifellos sehr komplex, kommt doch das beobachtete Resultat durch das Zusammenwirken von mindestens drei verschiedenen Phänomenen

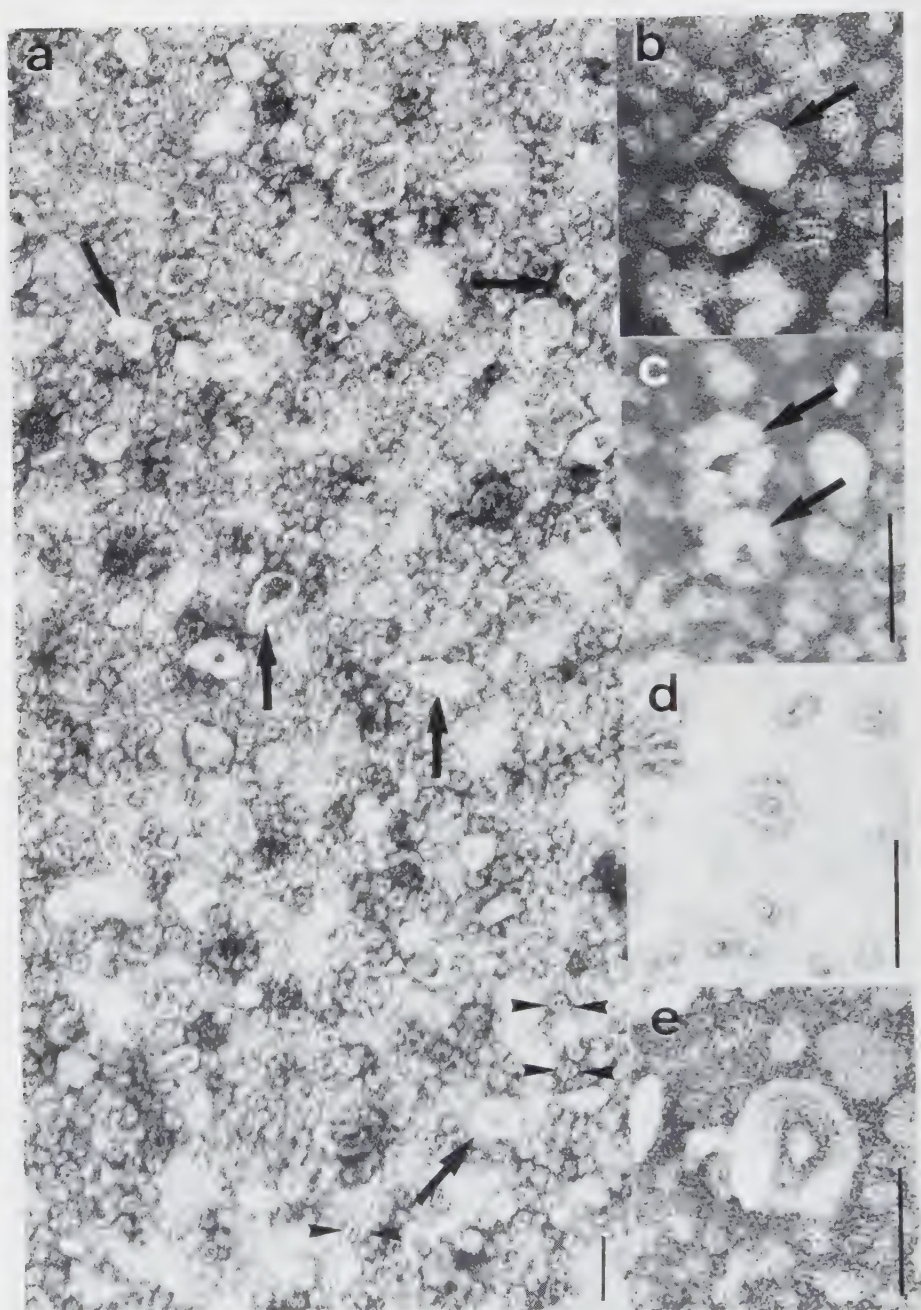
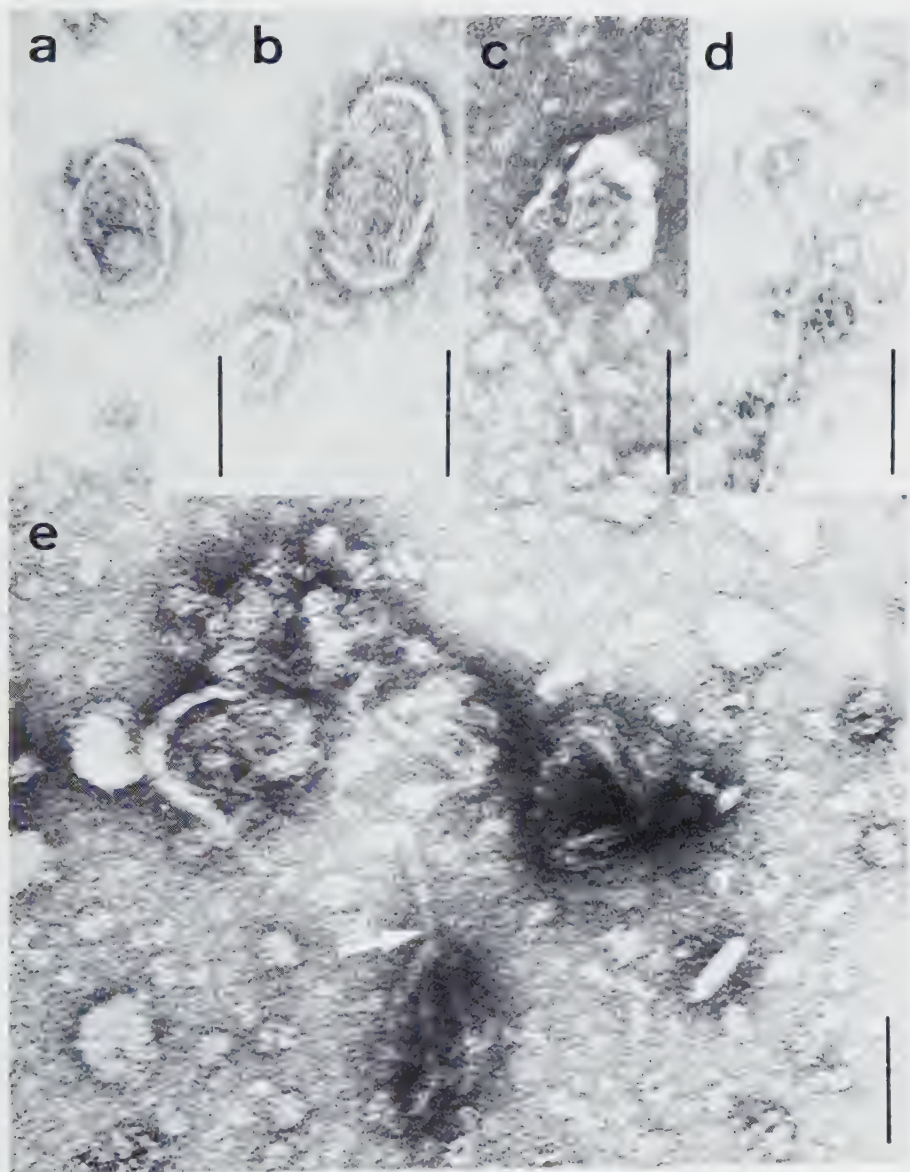


Abb. 10



ADD. 11

Abb. 10 : Negativ-kontrastierte Präparation der chitosomalen Chitinsynthetase von *A. bisporus*. Die Balken repräsentieren 100 nm. (a) Ein Feld von Chitosomen, das die morphologische Variation sowie die Gegenwart von kontaminierenden Partikeln – wahrscheinlich Fettsäuresynthetase (Pfeilköpfe) und Ribosomen – aufzeigt. (b) Ein sphäroides Chitosom (Pfeil). (c) Zwei 'klassische' proctoide Chitosomen (Pfeile). (d) Ein cycloides Chitosom. (e) Eine Struktur mit Ähnlichkeit sowohl zum proctoiden als auch zum cycloiden Chitosomentyp. (Elektronenmikroskopische Arbeiten durch Dr. L. Nyhlén ausgeführt).

Abb. 11 : Negativ-kontrastierte myceliale Chitinsynthetase nach der Inkubation (7-10 min) mit Substrat und Aktivatoren. Verschiedene Stadien der chitosomalen Umformung oder Grade der Fibrillogenese (vgl. Bracker et al. 1976) wurden beobachtet : Vesikel mit teilweise granulären und teilweise fibrillären inneren Strukturen (a); Chitosom mit grobem fibroidem Material (b); Chitosom mit geöffneter Schale, aus dem Innern eine Fibrille ausstossend (c,d); eine lange Fibrille, die Kontinuität mit einer fibroiden Partikel ohne Schale zeigt (e : Pfeil). Die Balken repräsentieren 100 nm. (Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Dr. L. Nyhlén).

zustande : (i) Extraktion von membran- und/oder wandgebundener Chitinsynthetase (und anderer Proteine) durch das Detergens sowie (ii) Stimulation und (iii) Inhibition der Enzymaktivität bei mittleren bzw. hohen Digitoninkonzentrationen (s. Abb. 17), wobei sich diese Effekte offensichtlich überlappen (vgl. hierzu auch Diskussion). Die absoluten Konzentrationen von Digitonin, welche hier Stimulation oder Inhibition des Enzyms hervorrufen, sind wegen der grösseren Mengen an kontaminierendem Material, welches einen Teil des applizierten Digitonins komplexiert (wie Sterole und ähnliche Verbindungen : vgl. Haslam und Klyne 1953), nicht direkt mit den im analogen Versuch mit Chitosomen (Abb. 17) beobachteten Resultaten vergleichbar. Die Korrektheit der Annahme, dass Inkubation des mycelialen Homogenates mit Digitonin tatsächlich eine zusätzliche Extraktion von Chitinsynthetase bewirkt, wird durch das Auftreten eines weiteren Chitosomen-Peaks bei der Dichtegradient-Zentrifugation einer solchen Präparation gestützt (vgl. Abb. 9b).

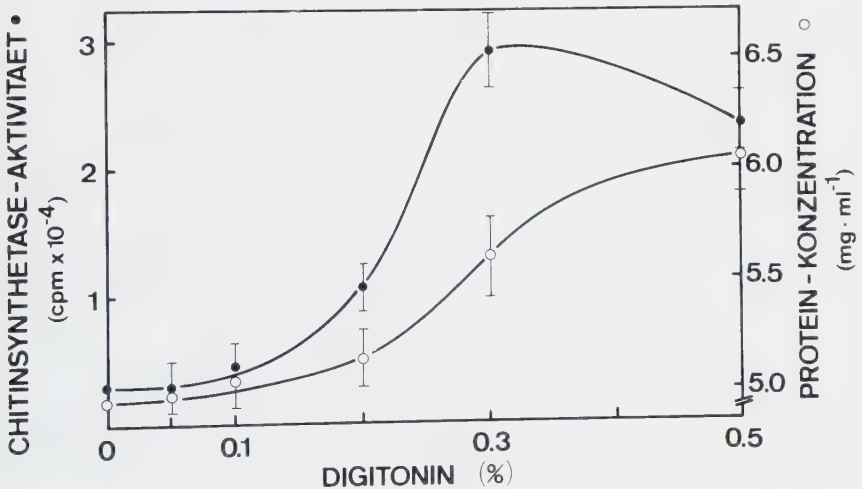


Abb. 12 : Chitinsynthetase-Aktivität und Proteinkonzentration des 54'000 X g-Ueberstandes nach Inkubation von Aliquoten des mycelialen Homogenates (vgl. Methoden) von *A. bisporus* mit Digitonin (7 min bei 4 °C, gefolgt von einer Zentrifugation bei 4000 X g). Es sind die Endkonzentrationen des Saponins angegeben.

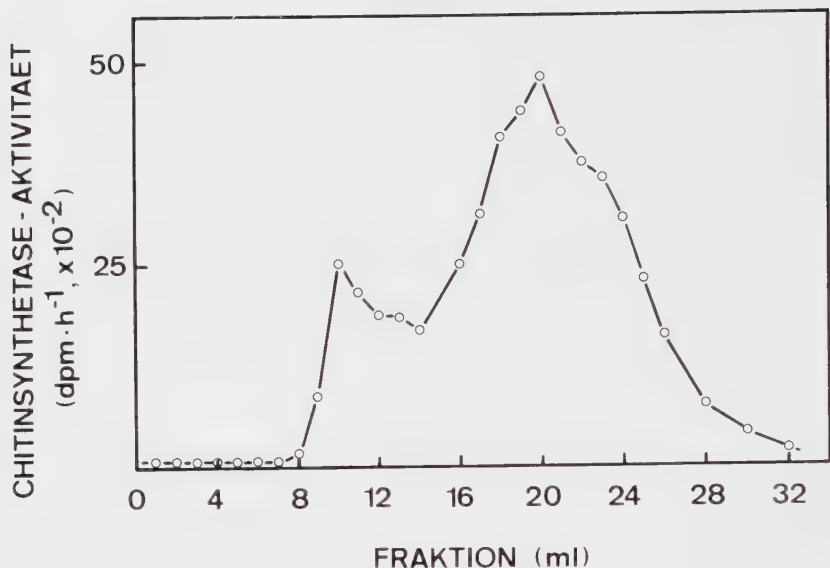


Abb. 13 : Auftreten 'schwerer' (vgl. Abb. 25) Chitosomen nach Digitonin-Extraktion des 54'000 X g-Sedimentes, Zentrifugation bei 54'000 X g und Dichtegradient-Zentrifugation (5-50% Saccharose) eines Aliquotes des Ueberstandes.

Interessanterweise wurden vor allem Chitosomen des zweiten Typs erhalten, wenn das 54'000 X g-Sediment mit Digitonin inkubiert wurde (Abb. 13), das ca. 60% der totalen Chitinsynthetase-Aktivität (bezogen auf den 4000 X g-Ueberstand) enthält (ein Vergleich : der entsprechende Wert für *M. rouxii* beträgt beinahe 90% (Ruiz-Herrera et al. 1975)).

Die Langzeitstabilität der Chitosomen wurde durch die Anwesenheit von Digitonin im Medium wenig beeinflusst. (Abb. 14). Bei hohen Saponinkonzentrationen waren die Aktivitäten immer ca. 25% tiefer, bei sehr niedrigen Konzentrationen bis zu 15% höher als bei der Kontrolle. Beide Effekte können direkt der inhibierenden bzw. stimulierenden Wirkung des Digitonins auf die Aktivität des Enzyms zugeschrieben werden (vgl. Abb. 17 und oben). Somit ist die "stabilisierende" Wirkung des Saponins auf die Chitinsynthetase – von Gooday & de Rousset-Hall (1975) besonders betont – sehr gering.

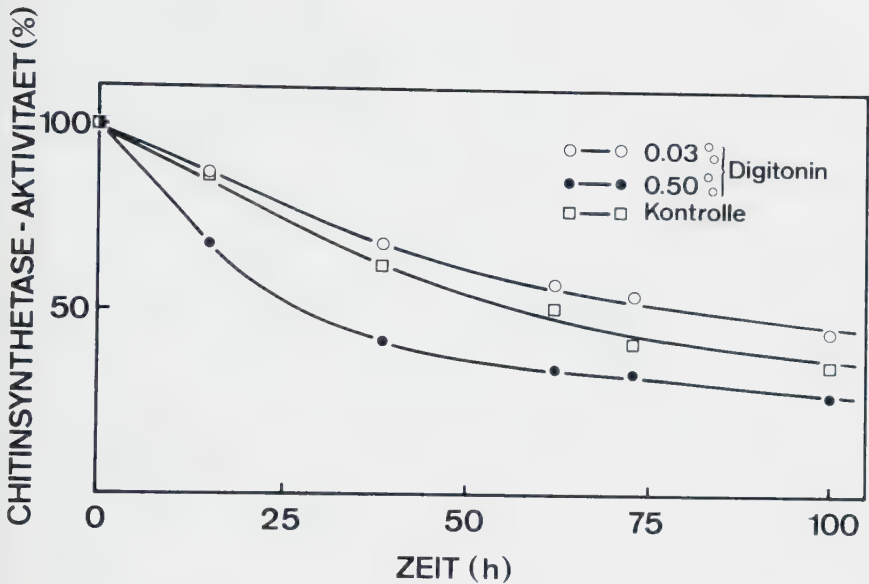


Abb. 14 : Einfluss von Digitonin auf die Langzeitstabilität der chitosomalen Chitinsynthetase (als das Zymogen bei 4 °C aufbewahrt) von Champignonmycelium.

1.2. Identifikation des Reaktionsproduktes

Aus dem enzymatischen Abbau (für Details vgl. II. 2.3.) der von 16 S- oder chitosomalem Enzym synthetisierten ^{14}C -markierten Substanz resultierten hauptsächlich radioaktive Produkte, die mit Diacetylchitobiose und N-Acetylglucosamin co-chromatographierten. Ein weiteres markiertes Produkt konnte nicht näher identifiziert werden. Es handelt sich dabei mit Sicherheit nicht um Glucosamin. Aus diesen Ergebnissen kann, wie auch bei anderen Pilzen (vgl. Bartnicki-Garcia, 1978), geschlossen werden, dass das Enzym ein Polymeres des N-Acetylglucosamins, also Chitin, synthetisiert.

2. Regulatorische Eigenschaften des Enzyms

In der nativen Form zeigt das Enzym eine recht geringe Aktivität; es liegt, wie von den meisten anderen Chitinsynthetasen bekannt, als Zymogen vor und bedarf deshalb proteolytischer Aktivierung. Die Sensitivität auf Proteasen war insofern spezifisch, als Pronase ein ausgezeichneter Aktivator war (8fache Stimulation der Enzymaktivität), während Rennilase sich als beinahe wirkungslos erwies (Abb. 15).

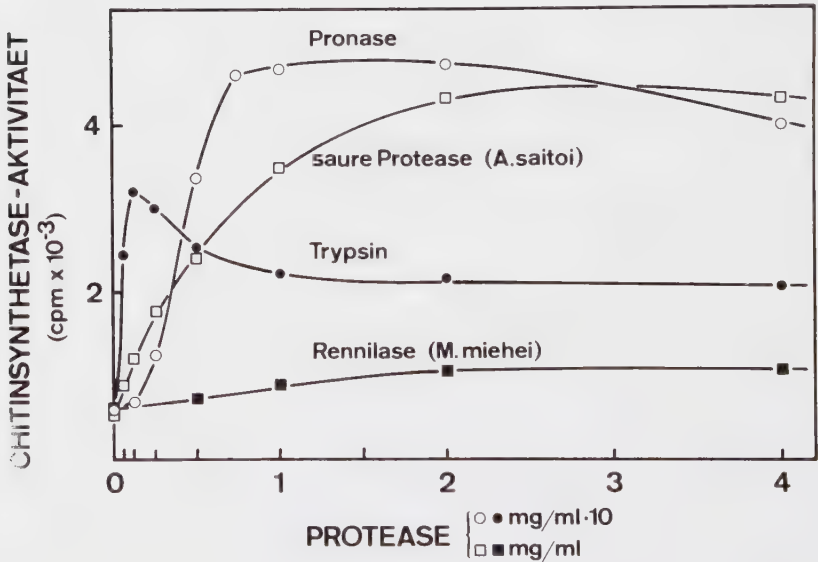


Abb. 15 : Einfluss verschiedener Proteasen auf die Aktivität der chitosomalen Chitinsynthetase von *A. bisporus*.

Eine saure Protease (aus *Aspergillus saitoi*) war ebenfalls sehr gut. Trypsin schliesslich zeitigte lediglich einen mittleren Aktivierungsgrad, der zudem nur in einem relativ engen Konzentrationsbereich aufrecht erhalten wurde.

Der Einbau von radioaktivem Substrat in das Produkt war der Proteinkonzentration direkt proportional und – bei der gewählten UDPGlcNac-Konzentration (0,4 mM) – über längere Zeit konstant (d.h. bis zu 60 min). Die graphische Darstellung der Enzymaktivität als Funktion der Substratkonzentration ergab eine sigmoide Kurve. Die Anwesenheit eines zweiwertigen Kations, in Form von Mg^{2+} , scheint eine absolute Notwendigkeit für Aktivität des Enzyms zu sein. Mit Mn^{2+} konnte nur 30% der mit Mg^{2+} erreichbaren maximalen Stimulation erzielt werden, und Ca^{2+} hatte überhaupt keinen Effekt. Bei der optimalen Konzentration (20 mM; bei UDPGlcNac = 0,4 mM) bewirkte GlcNac eine 4fache Steigerung des Einbaus von radioaktivem Substrat in Chitin. Der apparente K_m für UDPGlcNac betrug 0,9 mM, derjenige für GlcNac 1,0 mM. Der Hill-Plot (Werte in Anwesenheit von GlcNac aufgenommen) war monophasisch, mit $n_H = 1,7$, woraus geschlossen werden kann, dass mindestens zwei Bindungsstellen für das Substrat vorhanden sind.

3. Modulation der Aktivität von Chitinsynthetase durch fungitoxische Antibiotika

3.1. Nikkomycine

Nikkomycine – wie die Polyoxine (Isono et al. 1969) von gewissen Streptomyceten ins Kulturmedium exudierte Nukleosid-peptidantibiotika – zeigen ausgezeichnete antifungale Wirkung gegen die verschiedensten Chitin synthetisierenden Pilze (Dähn et al. 1976). Nikkomycin X hemmt die chitosomale Chitinsynthetase von *A. bisporus* sehr stark; der K_i beträgt 1,5 μM (Abb. 16). Der Dixon-Plot (Dixon 1953) zeigt einen kompetitiven Typ der Inhibition an. Dasselbe gilt für Nikkomycin Z; der K_i ist jedoch etwas höher (8,5 μM).

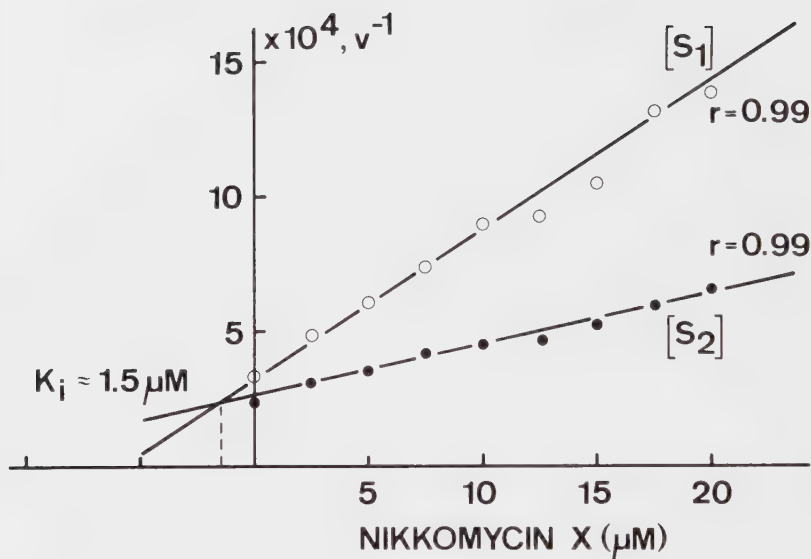


Abb. 16 : Graphische Bestimmung der Inhibitorkonstante von Nikkomycin X nach Dixon. S_1 und S_2 , Substratkonzentrationen (0,6 mM resp. 1,0 mM UDPGlcNAc); v , Einbaerate des Substrates in Chitin (nmol/min·mg Protein).

3.2. Saponine

Das Antimykotikum Digitonin (Wulff 1968; Tschesche & Wulff 1973) hat ebenfalls einen Einfluss auf die Chitinsynthetase (Abb. 17); er besteht in einer sehr starken Stimulation der Aktivität (bis zu 300%) bei niedrigen Konzentrationen (um 0,03%) und in einer Hemmung bei höheren Konzentrationen (bis zu 50% bei 0,5%, also 4 mM). Der stimulierende Effekt des strukturell verwandten Saponins α -Tomatin war dagegen recht gering (etwa 10%). Dieser Unterschied kann nicht einer schlechteren Löslichkeit von α -Tomatin zugeschrieben werden, da eine äthanolische Lösung

des Saponins in einer Endkonzentration von 10 μM die Chitinsynthetase-Aktivität um 35% erhöhte, während Aethanol in derselben Konzentration diese um 25% stimulierte.

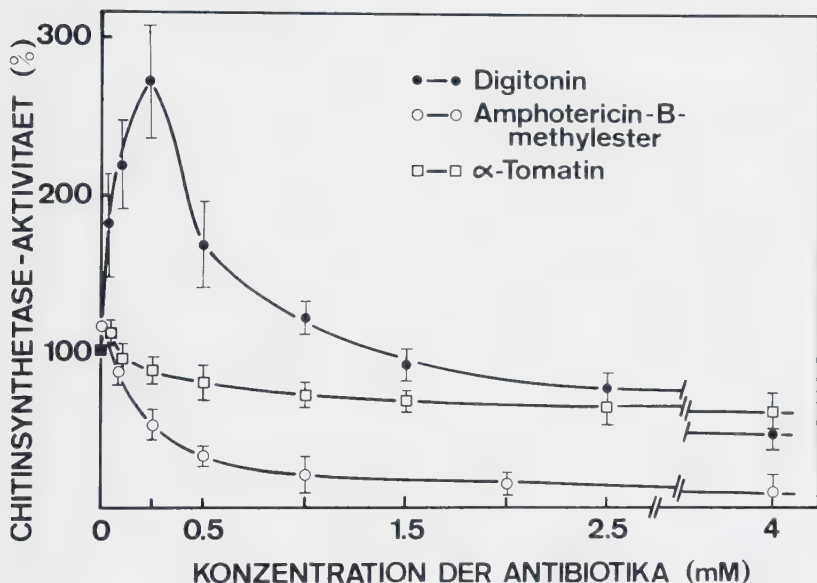


Abb. 17 : Einfluss von Amphotericin B-methylester und Saponinen auf die Aktivität der chitosomalen Chitinsynthetase von *A. bisporus*.

Das kommerziell erhältliche Digitonin wird bekanntlich aus Samen von *Digitalis purpurea* isoliert und ist ein Rohprodukt mit einer Reinheit von 60-80%. Es ist nicht bekannt, ob der beobachtete Effekt des Digitonins (Abb. 17) auf ein und dieselbe Molekülspezies zurückzuführen ist oder eventuell eine Summierung der Wirkung mehrerer Komponenten des Gemisches darstellt. Es erschien deshalb als interessant zu vergleichen, welchen Effekt ein aus einer eng verwandten

Spezies (*Digitalis lanata*, Blätter) isoliertes, chromatographisch reines Saponin auf die Chitinsynthetase hervorrufen würde.

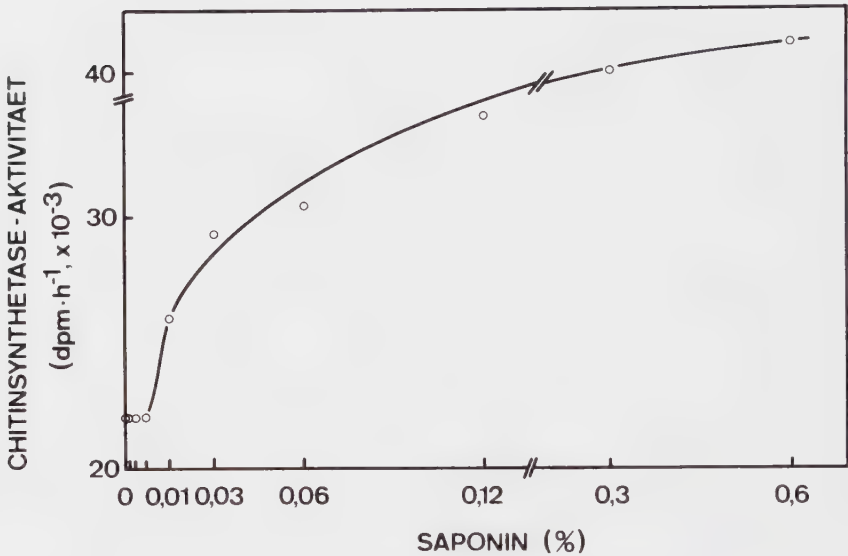


Abb. 18 : Einfluss eines aus Blättern von *Digitalis lanata* isolierten Saponins auf die Aktivität von chitosomaler Chitinsynthetase.

Die Abb. 18 zeigt, dass in keiner der getesteten Konzentrationen (gemessen wurde bis 5 mM) eine Hemmung der Enzymaktivität auftritt. Auffallend ist auch, dass zur Stimulation des Enzyms ein gewisser Schwellenwert der Saponinkonzentration erreicht werden muss, worauf diese aber dann unmittelbar und markant auftritt.

3.3. Amphotericin B-methylester

Auch das semisynthetische Polyenmakrolidantibiotikum Amphotericin B-methylester inhibierte das Enzym; der aus dem Dixon-Plot bestimmte K_i betrug 0,1 mM ($r^2 = 0,99$). Bei niedrigen Konzentrationen (ca. 1/10 des K_i -Wertes) bewirkte das Agens eine leichte Stimulation der Enzymaktivität (vgl. Abb. 17).

4. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w}$ von Chitosomen

Die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w}$ der Chitosomen einer Peak-Fraktion (Abb. 19a) erfolgte mittels analytischer Ultrazentrifugation (Schlieren-Technik). Bei der Berechnung des $s_{20,w}$ wurde berücksichtigt, dass die Saccharosekonzentration im Medium noch 2% betrug. Als partielles spezifisches Volumen wurde 0,72 eingesetzt (vgl. Handbook of Biochemistry, 2nd ed. und II/2.5.).

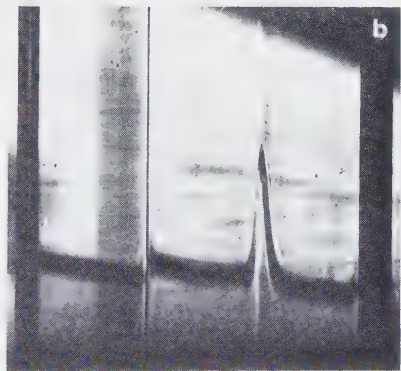
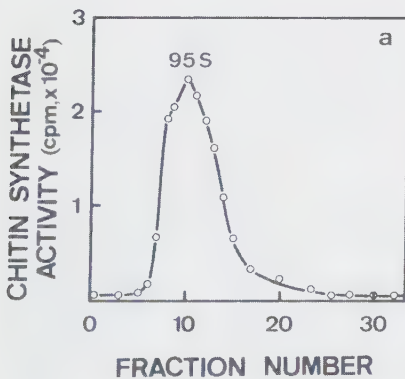


Abb. 19 : Sedimentationsverhalten chitosomaler Chitinsynthetase von *A. bisporus*. (a) In einem Saccharosedichtegradienten (5-50%); (b) in 2% Saccharose (unter Verwendung der Schlieren-Optik: für Details vgl. II/2.6.).

D. DISSOZIATION UND REKONSTITUTION VON CHITOSOMEN

1. Dissoziation von Chitosomen in aktive Untereinheiten (16 S)

Das Ausgangsmaterial repräsentierte alle Typen von Chitosomen und enthielt auch die kontaminierenden Partikel, wie sie selbst in gereinigten Präparationen noch auftreten (s. Abb. 10 sowie Bracker et al. 1976). Der Zerfall von Chitosomen in kleinere Einheiten mit Chitinsynthetase-Aktivität scheint ein sehr anspruchsvoller Prozess zu sein, da er weder bei niedrigen Konzentrationen (um 0,04%, d.h. Konzentrationen, bei welchen das Enzym maximal stimuliert wird), noch bei relativ hohen, d.h. inhibierenden Konzentrationen (vgl. Abb. 17), erfolgt. So konnten nur dann – nach Zentrifugation des Chitinsynthetase/Saponin-Gemisches durch einen 5-20% Dichtegradienten (für Details vgl. Text zu Abb. 20) – aktive Untereinheiten nachgewiesen werden, wenn die Inkubation der Chitosomen in ca. 0,1% Digitonin erfolgt war. Die höchste Ausbeute – bestimmt anhand der enzymatischen Aktivität der Untereinheiten – resultierte bei Zentrifugation

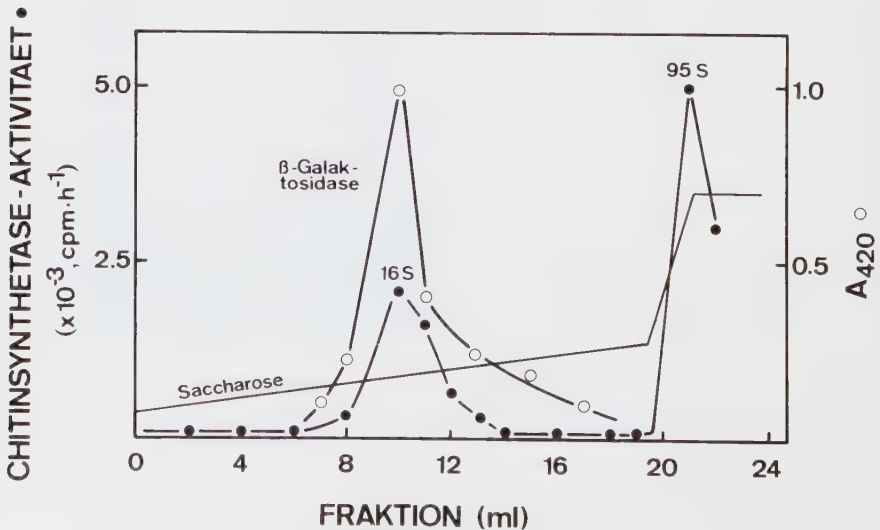


Abb. 20

Abb. 20 : Bildung von 16 S-Partikeln mit Chitinsynthetase-Aktivität nach Behandlung von Chitosomen (95 S) mit Digitonin (0,1%). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C während 14 h, worauf Aliquote des Gemisches durch einen Digitonin enthaltenden Saccharosedichtegradienten (5-20%, linear; auf Kissen von 50% Zucker) zentrifugiert wurden. β -Galactosidase diente als Referenz (für Details vgl. II/2.5.).

durch einen Gradienten, der das Saponin ebenfalls zu 0,1% enthielt. Die so erhaltenen Chitin synthetisierenden Partikel co-sedimentierten mit β -Galactosidase, einem ovoiden Protein mit einem Sedimentationskoeffizienten von 16 S und einem MG von ca. 500'000 (Sund & Weber 1963). Die Fraktionen 20-21 des Gradienten in Abb. 20 repräsentieren nicht-dissoziierte Chitosomen. Die Tatsache, dass zwischen den Populationen der 16 S- und der 95 S-Partikel keine intermediären Formen auftreten, deutet darauf hin, dass der Dissoziationsprozess ein "entweder-oder"-Phänomen darstellt – in dem Sinne, dass kein gradueller Verlust von 16 S-Partikeln aus den Chitosomen erfolgt, sondern dass dieses dann zerfällt, wenn alle Untereinheiten "titriert" worden sind.

Ein Pool von Chitinsynthetase, der in 0,3% Digitonin inkubiert worden war, zeigte nach der Sedimentation der Chitosomen – derart, dass selbst 55 S-Partikel pelletierten (d.h. bei 160'000 X g, 70 min) – erwartungsgemäss keine Aktivität mehr (vgl. Tab. 3). Wurde dieser aber so zentrifugiert, dass auch 16 S-Partikel sedimentierten (160'000 X g, 4 h 20 min), und das Sediment in Puffer homogen aufgenommen, so konnte Chitinsynthetase-Aktivität nachgewiesen werden, die sogar höher war als diejenige einer ursprünglich in 0,1% Digitonin inkubierten, sonst

aber gleich behandelten Chitosomenpräparation (Tab. 3). Folglich kann das Fehlen von Aktivität nach Inkubation der Chitosomen bei höheren Saponinkonzentrationen ($> 0,1\%$) nicht als Ausbleiben der Solubilisierung interpretiert werden, sondern bedeutet fehlende Aktivität der freigesetzten Untereinheiten, was eine direkte Interaktion zwischen den 16 S-Partikeln und Digitonin anzeigt. Die in Tab. 4 angegebenen Resultate zeigen, dass dissoziierte Chitinsynthetase (in $0,1\%$ Digitonin) durch Erhöhung der Saponinkonzentration zudem eine zunehmende Inhibition erfährt, die allerdings weniger stark ausfällt, als aufgrund der in Tab. 3 aufgeführten Ergebnisse zu erwarten wäre (vgl. Diskussion).

Die Integration der den Chitinsynthetase-Aktivitäten entsprechenden Peak-Flächen ergibt eine formale Dissoziationsrate von 12-15% (Werte von 4 Experimenten). Da Digitonin bei der verwendeten Konzentration jedoch immer noch eine leichte Stimulation der Aktivität der chitosomalen Chitinsynthetase bewirkt (vgl. Abb. 17) und gleichzeitig die 16 S-Untereinheiten hemmt (Tab. 4), ist Berechnung einer exakten Prozentzahl von dissoziierter Chitinsynthetase nicht sinnvoll, und zwar weder mittels dieses Vorgehens, noch durch Ermittlung des Quotienten der im Pool der Untereinheiten und der in dem von Chitosomen und Untereinheiten nach Inkubation im Saponin gebildeten Gemisch gefundenen Aktivitäten (Ruiz-Herrera et al. 1980).

Die ultrastrukturelle Analyse isolierter 16 S-Pools (Peakfraktionen 10-12; Abb. 20) zeigte, dass die durch Digitonineinwirkung auf Chitosomen entstehenden 16 S-Partikel einen Durchmesser von 10-20 nm aufweisen (Abb. 21e). Bei Inkubation einer Probe dieser Fraktion mit Pronase, Mg^{2+} , GlcNAc und UDPGlcNAc erfolgt Bildung langer Fibrillen, die Kontinuität mit den 16 S-Partikeln zeigen, womit diese ein-

TABELLE 3

Chitinsynthetase-Aktivität in Subfraktionen einer chitosomalen Präparation nach deren Inkubation (12 h, 4 °C) in Digitonin (0,1 bzw. 0,3%)

Fraktion	Totale Aktivität im Pool (dpm · h ⁻¹)
(1) Chitosomenpräparation	
ohne Digitonin (Kontrolle)	(a) 4'222'800
in 0,1% Digitonin	(b) 3'520'000
in 0,3% Digitonin	(c) 1'608'000
(2) Ueberstand von (1) nach Sedimentation der Chitosomen	
	(a) 0
	(b) 236'400
	(c) 0
(3) Sediment von (2) nach Pelletieren der 16 S-Partikel (in Puffer aufgenommen)	
	(a) 0
	(b) 630'050
	(c) 739'100

TABELLE 4

Einfluss von Digitonin auf aus Chitosomen isolierte (vgl. II/2.4.) 16 S-Chitinsynthetase

Digitonin-Konzentration (%)	Enzymaktivität (dpm · h ⁻¹)	% Aktivität im Vergleich zur Kontrolle
0,050 ^a	3066	100
0,053	2960	96,5
0,057	2910	94,9
0,065	2866	93,5
0,080	2533	82,6
0,110	2066	67,4
0,170	1600	52,2
0,350	1433	46,7
0,650	1240	40,4

^aDie Kontrolle enthält 0,05% Digitonin (wegen Verdünnung (1:1) der Präparation im Assay).

deutig als Chitin synthetisierende Einheiten identifiziert sind (Abb. 21, f-g). Die dünnsten Fibrillen hatten einen Durchmesser von ca. 1 nm. Nach längerer Inkubation (≥ 10 min) waren die Netzen dermassen mit Fibrillen (etwa 4-6 nm dick) bedeckt, dass Assoziation zwischen diesen und 16 S-Partikeln nicht mehr deutlich erkennbar war.

2. Gewinnung von 16 S-Chitinsynthetase aus einer 'mixed-membrane'- und einer Wandfraktion

Aus der Inkubation eines zwecks Entfernung lose adhärrierender Chitosomen vorgängig mit Puffer gewaschenen 54'000 X g-Sedimentes (Membranen und kleine Wandfragmente) mit Digitonin (0,3%) resultierte Chitinsynthetase, die nach einer weiteren Zentrifugation bei 54'000 X g mit dem Ueberstand assoziiert war und nach Zentrifugation im Dichtegradienten (5-35% Saccharose) zu 100% als 16 S-Chitinsynthetase identifiziert werden konnte. Dasselbe gilt für die Inkubation des 4000 X g-Sedimentes (vorwiegend grössere Wandfragmente) in 0,3% Digitonin. Die Ultrastruktur dieser 16 S-Partikel und der von ihnen synthetisierten Fibrillen unterschieden sich nicht von derjenigen von aus mit Digitonin behandelten Chitosomen erhaltenen Untereinheiten. Die Freisetzung von 16 S-Chitinsynthetase aus diesen Zellfraktionen unterschied sich jedoch insofern von derjenigen aus Chitosomen, als über einen grossen Bereich von Digitonin (0,1-0,5%) beträchtliche Mengen von 16 S-Partikeln extrahierbar waren.

3. Eigenschaften der 16 S-Chitinsynthetase

Infolge der technischen Schwierigkeiten, grössere Mengen von 16 S-Partikeln durch Dissoziation von Chitosomen zu erhalten, wurden die regulatorischen Eigenschaften des Enzyms und die Modulation seiner Aktivität durch antifungale Agentien mit Pools von aus Wänden mit Digitonin extrahierter

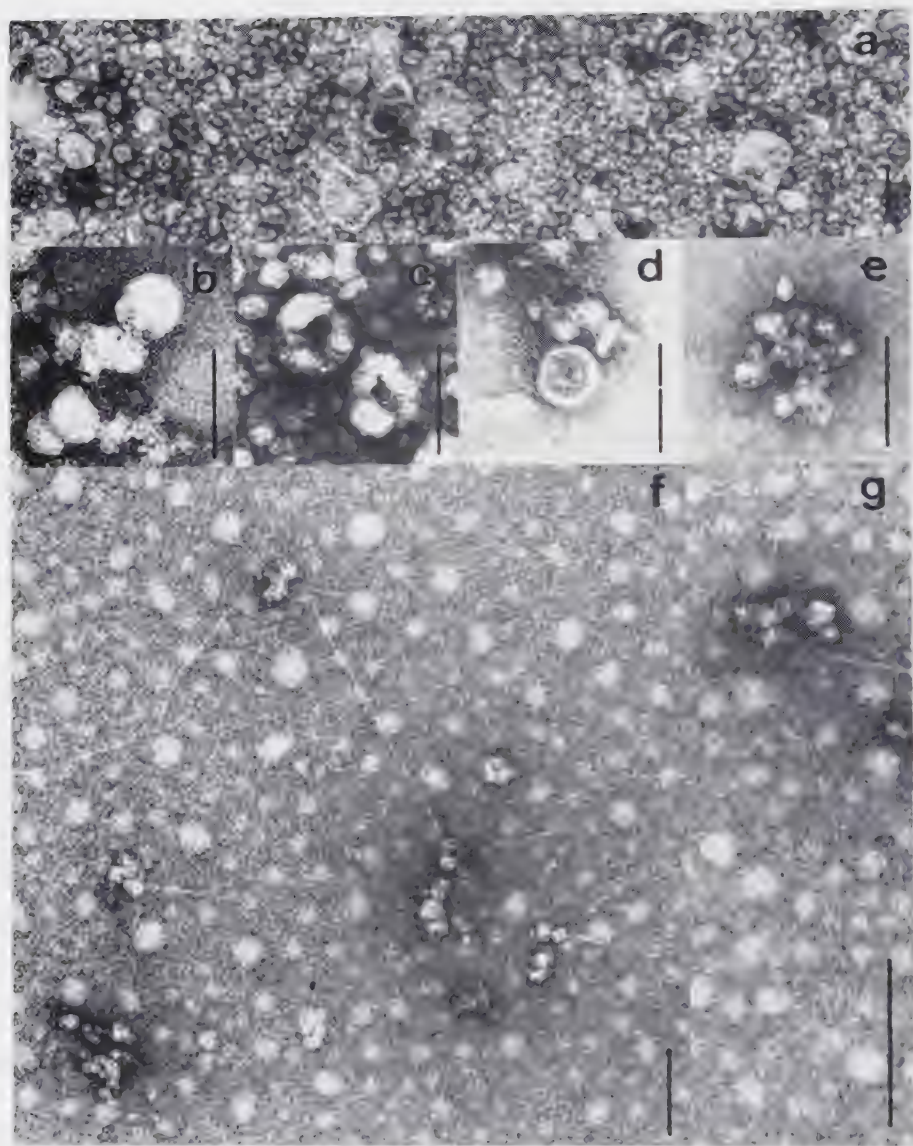


Abb. 21

Abb. 21 : Negativ kontrastierte Chitinsynthetase-Partikel. (a) Ein Feld von Chitosomen; X 100'000. (b)-(d) Sphäroide, proctoide und zyклоide Chitosomen; X 200'000. (e) Aggregat von 16 S-Partikeln (10-20 nm); X 200'000. (f)-(g) Chitosomale Untereinheiten (16 S) nach Inkubation (5 min) mit Substrat (UDPGlcNAc) und Aktivatoren (Pronase, Mg^{2+} , GlcNAc). Die Partikel zeigen Kontinuität mit langen, dünnen Chitinfibrillen, deren dünnste einen Durchmesser von ca. 1 nm aufweisen; X 150'000 (f); X 300'000 (g). Die Balken repräsentieren 100 nm (Elektronenmikroskopische Arbeiten durch Dr. L.E. Nyhlén ausgeführt).

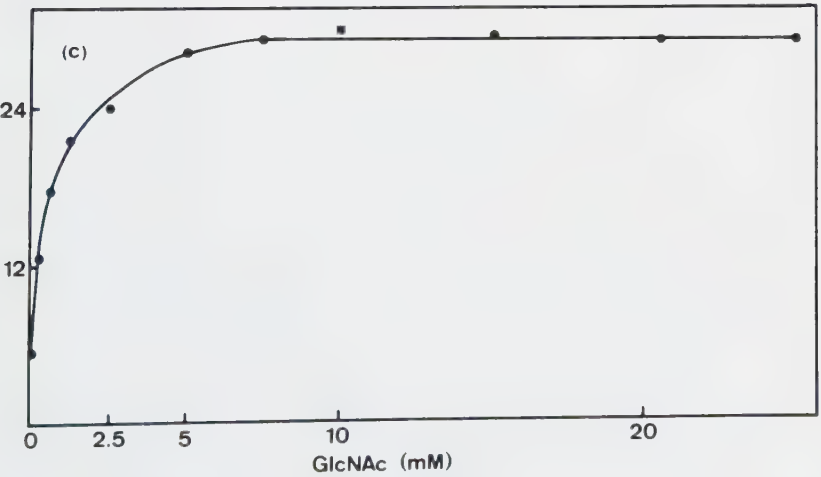
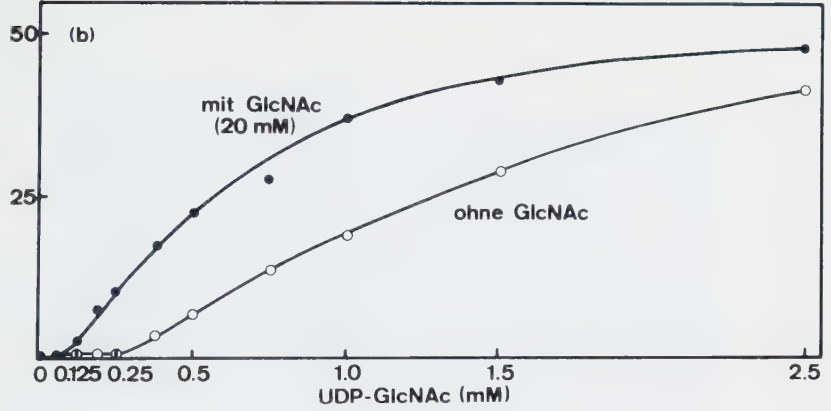
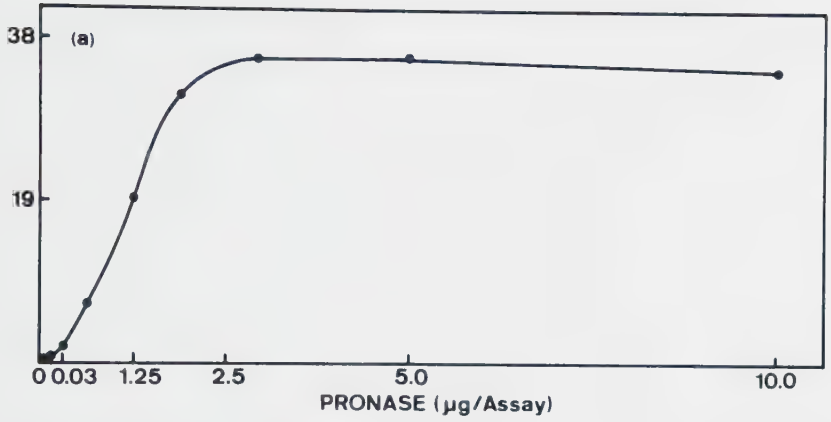
16 S-Chitinsynthetase bestimmt. Die spezifische Aktivität des so erhaltenen Enzyms lag bei 60-70 und war somit sogar höher als diejenige chitosomaler Präparationen (vgl. Tab. 2). Bei 4 °C aufbewahrt, verlor der 16 S-Pool innerhalb von 24 h 55% seiner ursprünglichen Aktivität, während nach 10 Tagen immer noch 10% davon nachgewiesen werden konnten. Selbst das dissoziierte, nicht-membrangebundene Enzym reagierte auf eine Erhöhung der Digitonin-Konzentration des Mediums. So betrug z.B. bei einer Saponin-Konzentration von 0,5% die vorhandene Restaktivität nur noch ca. 40% derjenigen der Kontrolle (in 0,1% Digitonin). Wie das chitosomale Enzym liegt auch die 16 S-Chitinsynthetase in latenter Form vor, bedarf sie doch einer proteolytischen Aktivierung. Maximale Aktivität wurde bei einer Pronasekonzentration von ca. 3 µg/Assay erreicht (Abb. 22a). Die graphische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration (in Abwesenheit von GlcNAc) ergab eine stark sigmoide Kurve (Abb. 22b). Der Hill-Koeffizient n_H (bestimmt aus den Werten der unteren Kurve in Abb. 22b) betrug 1,9, was das Vorhandensein von mindestens zwei Bindungsstellen für das Substrat anzeigt. Der Effekt von GlcNAc auf die Aktivität der 16 S-Chitinsynthetase (Abb. 22c) war

zwar prinzipiell derselbe wie derjenige auf das chitosomale Enzym, jedoch etwas ausgeprägter (ca. 550% bzw. 400% Stimulation: vgl. III/C.3.2.). Auch wurde die maximale Aktivität bei niedrigeren GlcNAc-Werten erreicht, und $K_m(\text{GlcNAc})$ war dementsprechend niedriger (0,8 verglichen mit 1,0 mM). Bei Zugabe von GlcNAc, und zwar in einer sättigenden Konzentration, betrug der $K_m(\text{UDPGlcNAc})$ 0,5 mM, während er in Abwesenheit von GlcNAc auf 1,0 mM, d.h. auf einen Wert, der ungefähr demjenigen des chitosomalen Enzyms entspricht, anstieg (vgl. III/C.2.). In Anwesenheit von GlcNAc ist der n_h erniedrigt (1,3 : für die experimentellen Daten vgl. Abb. 22b, obere Kurve). Bei höheren Substratkonzentrationen (5 mM) hatte GlcNAc keine stimulierende Wirkung mehr. Amphotericin B-methylester hemmt nicht nur das chitosomale Enzym (vgl. Abb. 17), sondern auch die 16 S-Chitinsynthetase. Aus einem Dixon-Plot der Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums (10-800 μM) ergab sich ein K_i von 90 μM und ein kompetitiver Typ der Inhibition.

Abb. 22 : Eigenschaften von 16 S-Chitinsynthetase (Peakfraktionen von 6 Gradienten gepoolt : vgl. Abb. 20). (a) Zymogenität (Standardinkubationsmedium : vgl. II/2.2.); (b) Kooperativität (mit und ohne GlcNAc); (c) Stimulation durch GlcNAc.

16S-CHITINSYNTHESE-AKTIVITÄT

(nmoles · h⁻¹)



4. Rekonstitution von Chitosomen aus 16 S-Subpartikeln

Das Verschwinden von 16 S-Chitinsynthetase nach der Zentrifugation eines Aliquotes von mit Digitonin behandelten Chitosomen in einen Gradienten ohne Digitonin unter gleichzeitiger Bildung von Chitin synthetisierenden Partikeln, welche schwerer als die chitosomalen Untereinheiten, aber leichter als Chitosomen sind (Abb. 23), zeigt, dass die 16 S-Partikel *in vitro* eine Tendenz zur Assoziation haben.

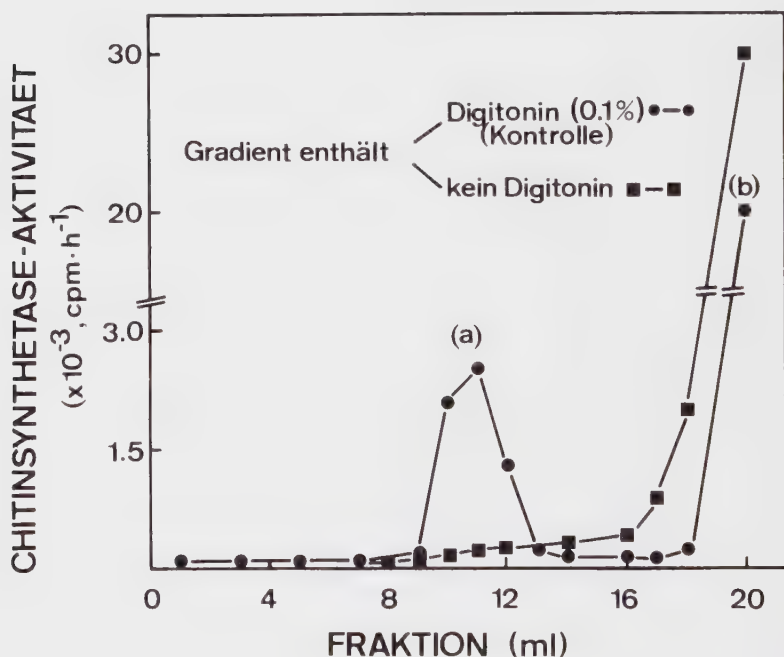


Abb. 23 : Verschwinden von chitosomalen 16 S-Untereinheiten und Bildung von Chitin synthetisierenden Partikeln mit Sedimentationskoeffizienten zwischen dissoziierter (a) und undissoziierter (b) Chitinsynthetase nach Zentrifugation einer mit Digitonin behandelten Chitosomenpräparation in einen linearen Saccharosedichtegradienten (für Details vgl. Methoden).

Die Beobachtung, dass die Aktivität des Chitosomenpools im digitoninfreien Gradienten nach der Zentrifugation wesentlich höher als diejenige der Kontrolle war, deutet an, dass die Aggregation auch vollständig sein, d.h. zur Rekonstitution von Chitosomen führen kann (Abb. 23). Im Gegensatz zur Dissoziation (vgl. oben) wäre die Rekonstitution damit ein eher gradueller Prozess, da Zwischenformen sowohl biochemisch (Abb. 23) als auch ultrastrukturell (Abb. 24) leicht nachweisbar sind.

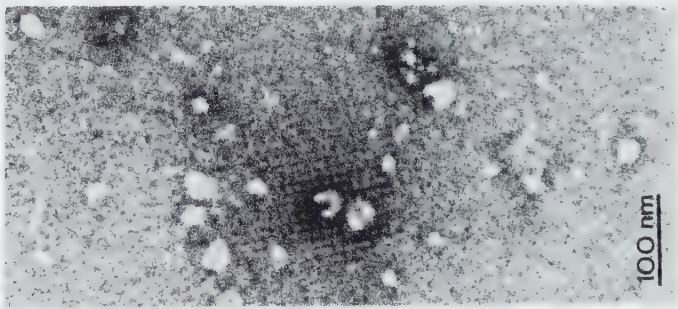


Abb. 24 : Partikel mit Chitinsynthetase-Aktivität (Fraktion 17 aus dem Gradient in Abb. 23, obere Kurve). Diese erscheinen nach der Negativkontrastierung hufeisenförmig und repräsentieren Zwischenformen von rekonstituierenden Chitosomen. (Elektronenmikroskopische Arbeiten durch Dr. L.E. Nyhlén).

Der direkte Beweis für eine Rekonstitution von Chitosomen aus chitosomalen Untereinheiten wurde durch die in Abbildung 25 und 26 dargestellten Resultate erbracht. Darnach liegen die Sedimentationskonstanten von rekonstituierten Chitin synthetisierenden Partikeln im Bereich der S-Werte von Populationen von nativen Chitosomen (Abb. 25a) und sind die rekonstituierten Partikel nach Negativkontrastierung ultrastrukturell von nativen Chitosomen (vgl. Abb 10 und 11) nicht unterscheidbar (Abb. 26).

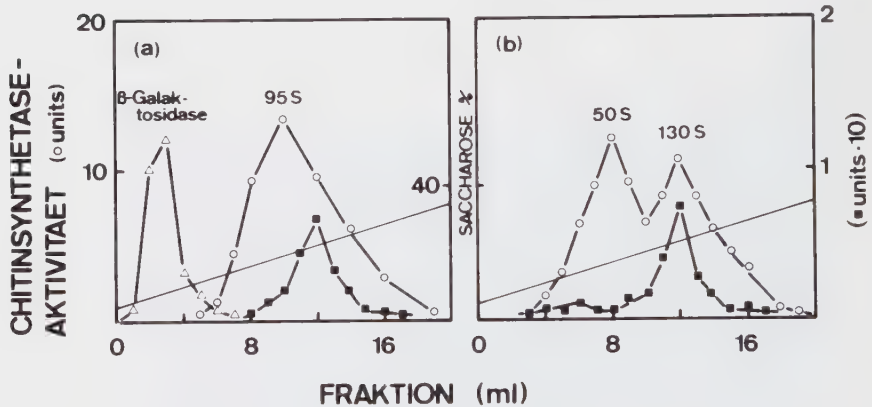


Abb. 25 : Rekonstitution von chitosomaler Chitinsynthetase aus 16 S-Chitinsynthetase nach Isolation von 16 S-Untereinheiten (vgl. Abb. 20, Fraktionen 10 und 11), Entfernung von Digitonin (vgl. Methoden) und Zentrifugation der so erhaltenen Präparation in einen Saccharosedichtegradienten. Bei (a) wurde ein Pool von nativen Chitosomen (vgl. Abb. 19a), in (b) ein Gemisch von separat abgefangenen 'leichten' (50 S) und 'schweren' (130 S) Chitosomen als Referenz verwendet. β -Galaktosidase diente als Vergleichssubstanz für die 16 S-Partikel.

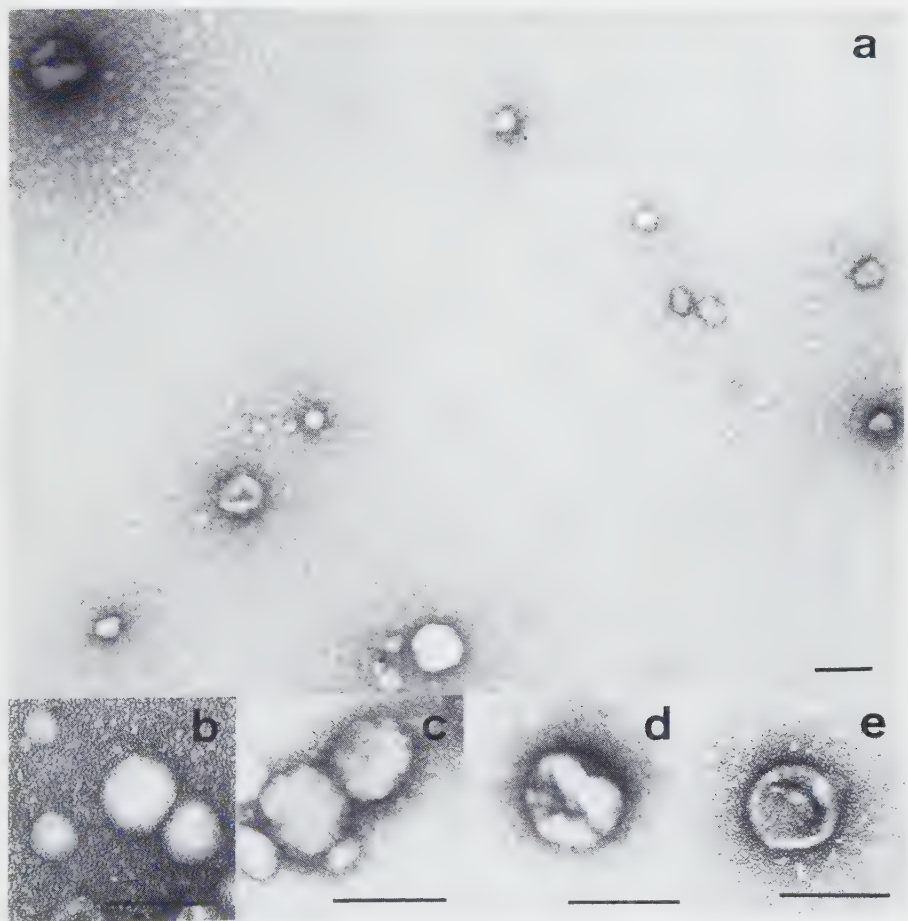


Abb. 26

Abb. 26 : Elektronenmikroskopische Darstellung negativ kontrastierter rekonstituierter Chitosomen. (a) Ein Feld mit vesikulären Partikeln in der Größenordnung von 40-110 nm. Bei dem gefleckten Hintergrund dürfte es sich um ein Trocknungsmuster handeln. X 100'000. (b)-(e) Partikel mit grosser Ähnlichkeit zu sphäroiden, sphäroid/proktoiden, 'klassischen' proktoiden bzw. zykloiden Chitosomen (vgl. Bracker et al. 1976 sowie Hänseler et al. 1983; s. auch Abb. 10); alle X 200'000. (Elektronenmikroskopische Arbeiten wurden durch Dr. L.E. Nyhlén ausgeführt).

Allerdings sind vollständige, gut abgegrenzte rekonstituierte Chitosomen (Abb. 26b-e) auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht häufig, und biochemisch besteht insofern ein Unterschied, als die Population von rekonstituierten Chitosomen eine wesentlich engere Grössenverteilung und einen höheren mittleren Sedimentationskoeffizienten (Abb. 25b) aufweist als die nativen Chitosomen, aus welchen die 16 S-Untereinheiten gewonnen worden waren. 'Schwere' Chitosomen konnten auch nach der Zentrifugation von aus einer Wand-(4000 X g-Sediment) oder einer 'mixed-membrane'-Fraktion (54'000 X g-Sediment) gewonnenen 16 S-Partikeln in einen Saccharosegradienten nachgewiesen werden (Abb. 27; es sind nur die Werte für das Enzym aus der Wandfraktion aufgeführt). Die Rekonstitution war in diesem Fall jedoch nur partiell (vgl. Abb. 27 mit Abb. 23), was darauf hinweist, dass 16 S-Partikel dieser Herkunft im Vergleich zu chitosomalen Untereinheiten eine geringere Tendenz zur Aggregation haben. Die reaggregierten Chitosomen waren vorwiegend vom 'schweren' Typ (vgl. Abb. 27 mit Abb. 9b).

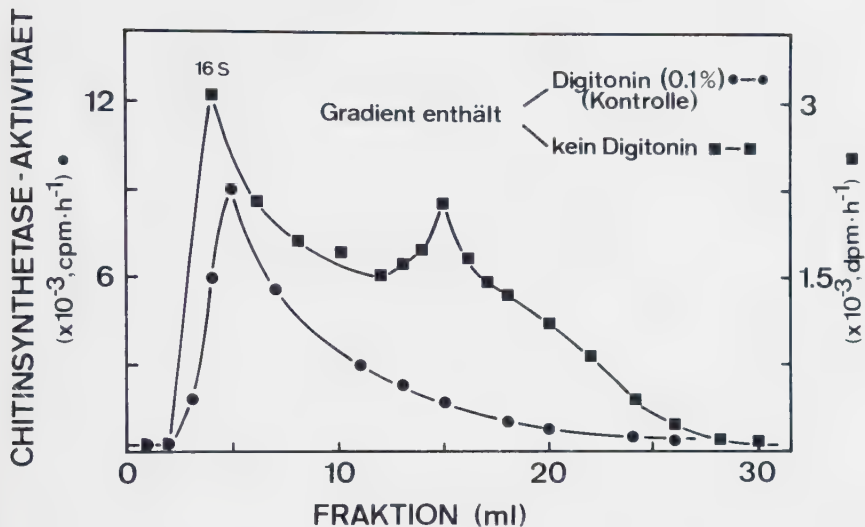


Abb. 27 : Partielle Rekonstitution von aus einer Wandfraktion durch Digitoninbehandlung extrahierten 16 S-Partikeln mit Chitinsynthetase-Aktivität bei Zentrifugation in einen saponinfreien Gradienten (vgl. hierzu Text zu Abb. 9).

E. EIN VERGLEICH DER CHITOSOMALEN UND DER ZELLULAEREN LIPIDE VON CHAMPIGNONMYCELIUM

1. Auftrennung in Lipidklassen

Mit Ausnahme des Gehaltes an polaren Lipiden und Sterolestern bestehen, wie Tab. 5 zeigt, im Lipidgehalt der untersuchten Fraktionen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Chitosomen und Hyphen. Sowohl im Mycelium wie auch in den Chitosomen stellen die polaren Lipide den grössten Anteil am Totallipid dar. Ferner wurden auch Mono- und Diacylglyceride nachgewiesen; sie tragen ca. 2% zum Totallipid bei.

TABELLE 5

Lipidgehalte von Chitosomen und vegetativen Hyphen von
A. bisporus

Lipidfraktion	Lipidgehalte ^a ; SA ^b	
	Chitosomen	Mycelium
Totallipid	5,9 ± 2,4	5,1 ± 0,8
polare Lipide	74,9 ± 1,5	68,1 ± 2,3
Phospholipide	21,8 ± 3,4	20,7 ± 5,2
Sterole	2,0 ± 0,8	3,3 ± 1,3
freie Fettsäuren	10,6 ± 1,1	10,4 ± 0,2
Triacylglyceride	12,7 ± 0,5	13,3 ± 2,3
Sterolester	Spur	1,7 ± 0,2

^aFür Totallipid in % des Trockengewichtes des Analysenmaterials, für alle anderen Fraktionen in % des Totallipids.

^b_n = 2-8; SA = Standardabweichung

2. Analyse der Phospholipid-Fraktion

Die Phospholipide wurden durch Vergleich mit Referenzsubstanzen nach zweidimensionaler Chromatographie (vgl. II/4.2.) identifiziert und die einzelnen Komponenten durch Nachweis des Phosphors quantitativ bestimmt. Im Mycelium bildeten Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin die Hauptkomponenten der Fraktion. Wie aus Tab. 6 hervorgeht, dominierten Phosphatidylsäure und Phosphatidyläthanolamin in der Phospholipidfraktion der Chitosomen; Uebereinstimmung in der Phospholipidkonzentration konnte nur beim Phosphatidylserin gefunden werden, während sich die anderen Werte deutlich von-

einander unterschieden, worunter vor allem der hohe Gehalt der Chitosomen an einem unbekannten Phosphoglycerid auffällt. Glykolipide wurden zwar gefunden; sie waren aber in so geringer Konzentration vorhanden, dass eine Identifikation nicht möglich war.

TABELLE 6

Phosphoglyceridzusammensetzung von Chitosomen und vegetativem Mycelium von *A. bisporus*

Phosphoglycerid	relative Prozentzahl	
	Chitosomen	Mycelium
Phosphatidylsäure	30,9	11,9
Cardiolipid	8,0	3,5
Phosphatidyläthanolamin	23,9	33,0
Phosphatidylinositol	3,9	0,9
Phosphatidylserin	3,9	4,4
Phosphatidylcholin	12,6	38,4
unbekanntes Phosphoglycerid	17,0	3,5
andere Phosphoglyceride	--	4,5

3. Fettsäurezusammensetzung von chitosomalen und zellulären Lipidfraktionen aus *A. bisporus*

Eine repräsentative Analyse der prozentualen Verteilung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidfraktionen ist in Tab. 7 dargestellt. Darnach stellen in allen Fraktionen Palmitin-, Stearin-, Oel- und Linolsäure zusammen den Grossteil der Fettsäuren (ca. 70-90%), wobei allerdings der gegenüber den zellulären Lipiden stark erhöhte Gehalt der FFS-Fraktion der

Chitosomen an Stearinsäure bemerkenswert ist. Ferner fällt auf, dass der prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuren in den aus dem Mycelium isolierten Lipiden der drei untersuchten Fraktionen ziemlich gleich ist, während im Material aus Chitosomen recht deutliche Unterschiede festgestellt werden können. So sind die FFS-Werte für Palmitin- und Stearinsäure hier wesentlich erhöht, diejenigen für Oel- und Linolsäure stark erniedrigt. Auch in der Triglyceridfraktion gibt es Unterschiede : der Gehalt der Chitosomen an Palmitinsäure ist ca. 100% höher; derjenige von Linolsäure beträgt ungefähr die Hälfte.

TABELLE 7

Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Lipiden verschiedener Klassen aus Chitosomen (Ch) und Mycelium (M) von *A. bisporus*

Säure	relativer Anteil an Fettsäurefraktion (%)					
	PL		FFS		TRIG	
	Ch	M	Ch	M	Ch	M
C ₁₂	--	--	--	--	--	--
C ₁₄	1,1	1,4	1,9	1,2	Spur	1,1
C ₁₆	14,0	13,9	24,2	16,7	11,9	6,6
C _{16:1}	1,0	1,3	2,3	1,6	1,2	1,4
C ₁₈	4,3	3,7	15,0	5,1	8,8	7,4
C _{18:19}	44,5	41,5	20,9	44,7	40,6	42,7
C _{18:26}	25,1	33,2	8,2	24,0	15,0	26,6
C ₂₀	1,3	1,2	1,7	1,3	1,4	1,2

PL, polare Lipide; FFS, freie Fettsäuren; TRIG, Triglyceride

4. Bedeutung der leicht-extrahierbaren Lipide für die Aktivität der chitosomalen Chitinsynthetase

Die in Tab. 8 aufgeführten Werte zeigen, dass eine Aetherextraktion keine für die enzymatische Funktion essentiellen Lipide entfernt, sondern dass – im Gegenteil – die Aktivität

TABELLE 8

Einfluss einer Aetherextraktion auf die enzymatische Aktivität der chitosomalen Chitinsynthetase. Nach Aufteilung der Enzympräparation in zwei gleiche Aliquote wurden diese lyophilisiert. Die eine Hälfte diente – in Puffer aufgenommen – als Kontrolle, der andere Teil wurde mit 3 ml Aether abs. extrahiert (2 h, 28 °C), der Rückstand mit 3 ml Aether gewaschen und mit dem ersten Ueberstand vereint zur Trockene gebracht (unter N₂). Der extrahierte Rückstand wurde getrocknet und ebenfalls in Puffer aufgenommen.

Behandlung der Chitosomen/ Supplement ^a zum Standard- assay ^b	Chitinsynthese- tase-Aktivität (dpm · 15 min ⁻¹)	Aktivität (in % der Kontrolle)
- / - (Kontrolle	4973 ± 568	100
Extraktion mit Aether / -	6854 ± 170	138
Extraktion mit Aether/ 25 µl Aether	9698 ± 859	195
Extraktion mit Aether / 25 µl Aetherextrakt von Chitosomen	8881 ± 1000	178

^aDiäthyläther abs.

^bvgl. II/2.2.

nach der Extraktion grösser ist (ca. 40%); die durch Addition von Aether in das Reaktionsmedium zusätzlich bewirkte Stimulation beträgt ca. 60%. Die Zugabe der extrahierten Lipide scheint die enzymatische Funktion eher wieder zu hemmen.

IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND DISKUSSION

Physiologische Charakterisierung und chemische Analyse des Ausgangsmaterials zur Isolation von Chitinsynthetase

Der Beweis für die Homogenität des Pilzmaterials aus der in dieser Arbeit erstmals routinemässig angewendeten Submerskultur von *A. bisporus* in einem Minimalmedium wurde optisch (Abwesenheit von "Pellets": D. Rast, G. Dütsch, H. Schatzmann und E. Hänseler, unveröffentlicht), durch Gaswechsellmessungen (paralleler Verlauf von Biomasseproduktion und Zunahme der CO₂-Konzentration der Kolbenluft während der log-Phase: Abb. 5), chemisch-analytisch (sehr geringe Standardabweichungen im Gehalt der Wand an verschiedenen Polysacchariden: Tab. 1) und auch biochemisch (durch die konstant hohen Chitinsynthetase-Aktivitäten) erbracht. Die Aktivität der hier isolierten Chitinsynthetase ist nicht nur höher als diejenige der entsprechenden Enzympräparation von Zellen von *S. cerevisiae* oder Mycelium von *Allomyces macrogynus*, *Neurospora crassa* und *M. rouxii*, sondern sogar derjenigen des Enzyms aus Hefe-Zellen von *M. rouxii* (Bartnicki-Garcia et al. 1978) – dem Standardsystem für die Isolation von chitosomaler Chitinsynthetase – und aus Zoosporen von *B. emersonii* (Mills & Cantino 1981) gleich. Gründe dafür, dass das auf dem hier verwendeten Medium gezogene Mycelium im Gegensatz zum Fruchtkörper des Champignons (Bartnicki-Garcia et al. 1978) eine sehr gute Quelle zur Isolation der Chitinsynthetase darstellt, sind wahrscheinlich die niedrige Aktivität von Phenolase (unveröffentlichtes Resultat) und das Fehlen ihres Substrates (Stüssi & Rast 1981), γ -Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB; wichtigste phenolische Komponente des Fruchtkörpers von *A. bisporus*: Rast et al. 1979), unter diesen Kulturbedingungen; denn dadurch wird ja die sonst stets latente Gefahr einer möglichen Quervernetzung von Polypeptidketten des Enzyms durch aus GHB unter Einwirkung von Phenolase gebildetes γ -Glutaminyl-3,4-benzochinon eliminiert (vgl. Van Sumere et al. 1975). Die

Submerskultur von *A. bisporus* scheint somit unter den hier verwendeten Bedingungen ein zur Isolation mycelialer Chitinsynthetase besonders geeignetes Ausgangsmaterial und – darüber hinaus – ein ideales Testsystem zum Studium von Problemen der Regulation der Chitinsynthese beim Hyphenspitzenwachstum darzustellen.

Das Hauptaugenmerk der bisher einzigen Studie über die myceliale Hyphenwand von *A. bisporus* hatte deren Ultrastruktur gegolten (Michalenko et al. 1976), wobei das Analysenmaterial aus statischen, 3wöchigen Flüssigkulturen gewonnen worden war. Wegen der in diesem System mit zunehmender Kulturdauer vermehrt auftretenden morphologisch-physiologischen Inhomogenitäten (neben Submers- auch Luftmycelium und Bildung kompakter Aggregate durch mit Schleim zusammengeklebte Hyphen) und einer durch die lange Inkubationszeit bedingten Nährstoffverknappung dürften wohl neben synthetischen zunehmend auch lytische Prozesse, worunter vor allem die Mobilisierung von R-Glucan durch entsprechende Glucanasen nach der Aufhebung der Katabolitrepression infolge Erschöpfung der C-Quelle des Mediums (vgl. Wessels 1966 und 1969), abgelaufen sein. Ferner beschränkten sich die Polysaccharidanalysen in dieser Arbeit auf die Bestimmung von KOH-löslichem Glykan (14% der Wandtrockensubstanz – wohl zum grössten Teil S-Glucan), R-Glucan (27%) und Chitin (43%). Demgegenüber enthält nun die Hyphenwand von in Rührkultur gezogenem homogenem (s. oben) Champignonmycelium 9% S-Glucan, 23% R-Glucan und lediglich 29% Chitin (vgl. Tab. 1) – Werte, die statistisch sehr gut gesichert sind. Der Chitingehalt wurde unter Berücksichtigung eines speziell ausgearbeiteten Korrekturfaktors für die bei der sauren Hydrolyse auftretenden Verluste sowohl kolorimetrisch als auch gravimetrisch ermittelt, wobei sich eine gute Uebereinstimmung der beiden Methoden ergab. Das wesentlich niedrigere R-Glucan/Chitin-Verhältnis in der Arbeit von Michalenko et al. (1976) dürfte somit auf die oben erwähnten Gründe zurückzuführen sein.

Die IR-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie nach der Pulvermethode sowie die Bestimmung der Reaktionsprodukte aus der sauren Hydrolyse des R-Glucan-Chitin-Komplexes und der Degradation der Glucane durch spezifische Polysaccharasen (Hänseler 1980) erlaubte eine genauere Charakterisierung der bis anhin vorwiegend nur anhand ihrer Löslichkeit beschriebenen Substanzfraktionen der Champignonwand. So konnte nach saurer bzw. enzymatischer Hydrolyse des chemisch isolierten Chitinkomplexes resp. von in vitro synthetisiertem Chitin Glucosamin resp. N-Acetylglucosamin nachgewiesen werden (ibid.) und stimmten die im Röntgendiffraktogramm gefundenen d-Werte recht gut sowohl mit denjenigen von Referenzchitin (aus Crustaceen) als auch mit den an der analogen Fraktion von *S. commune* gefundenen Daten überein (s. Sietsma & Wessels 1977 und III/B.2). Unfraktioniertes Wandmaterial zeigt diese typischen Banden hingegen nur sehr schwach (Hänseler 1980), was auf eine geringe Kristallinität der Chitinmikrofibrillen in situ hinweist und ein Phänomen darstellt, auf welches auch Wessels & Sietsma (1981) hinweisen. Umgekehrt wird allerdings die Auffassung vertreten, dass die Anwendung modifizierter Röntgenverfahren mit erhöhter Auflösung den Nachweis kristalliner Strukturen auch in unfraktionierten, vermeintlich amorphen Wänden gestatten würde (Beran et al. 1972). Ferner zeigt der hohe Grad der Uebereinstimmung der IR-Spektren und Röntgendiffraktogramme der S-Glucane von *A. bisporus* (Abb. 6 und 7) und *S. commune* (α -1,3-Glucan: Jelsma 1979) an, dass das S-Glucan aus *A. bisporus* ebenfalls ein α -1,3-Glucan ist, dessen Kristallinität sich allerdings als weniger ausgeprägt erweist. Schliesslich zeigen die folgenden Resultate, dass das R-Glucan von *A. bisporus* wie dasjenige von *S. commune* (Sietsma & Wessels 1977) ein β -1,3(β -1,6)-Glucan darstellt : (i) die Champignonwand beinhaltet eine Komponente, die erst nach deren Hydrolyse mit HCl KOH-löslich wird (Tab. 1); (ii) im aus diesem Pilzmaterial isolierten präsump-

tiven R-Glucan-Chitin-Komplex wird – nach Deacetylierung des GlcNAc-Polymers mittels NaOH (vgl. Sietsma & Wessels 1979) – durch Oxidation mit NO_2^- (ein Verfahren, das spezifisch das so gebildete Chitosan depolymerisiert (ibid.) 48% des R-Glucans solubilisiert (Sietsma & Wessels 1981); (iii) im HCl- und KOH-unlöslichen Wandrückstand ist anthron-positives Material enthalten (Tab. 1); (iv) das R-Glucan ist auf β -1,3-Glucanase suszeptibel (Hänseler 1980).

In Submerskultur auf synthetischem Medium gezogenes Mycelium von *A. bisporus* hat einen höheren Anteil an polarem Lipid (Verhältnis neutrale:polare Lipide = 0,47) als auf Kompost kultiviertes Mycelium (das resp. Verhältnis beträgt 1,96-3,80: Holtz & Schisler 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde – in Uebereinstimmung mit den Resultaten von Byrne & Brennan (1975) und O'Sullivan & Lösel (1971) – Phosphatidylcholin in der Phospholipidfraktion der vegetativen Hyphen identifiziert. Dies im Gegensatz zu Holtz & Schisler (1971) und Griffin et al. (1970), welche diese Komponente in den von ihnen untersuchten Stämmen von *A. bisporus* nicht nachweisen konnten. Ein grosser Unterschied zu den Ergebnissen von Holtz & Schisler (1971) sowie Byrne & Brennan (1975) wurde in bezug auf die Zusammensetzung der Fraktion der ungesättigten Fettsäuren gefunden : während das Verhältnis $\text{C}_{18:1} : \text{C}_{18:2}$ in den beiden erwähnten Arbeiten mit ca. 1 angegeben wird, variieren die hier gefundenen Werte zwischen 1,25 und 1,86 (in der Fraktion der Phospholipide bzw. freien Fettsäuren). Der Grad der Ungesättigtheit ist folglich in allen hier analysierten Fraktionen deutlich geringer. In Uebereinstimmung mit der Arbeit von Byrne und Brennan (1975), aber im Gegensatz zu Holtz & Schisler (1971), konnten schliesslich auch Sterole als Bestandteil des mycelialen Lipids identifiziert werden (vgl. III/E.1), wobei Ergosterol – typisches Sterol der Homobasidiomyceten (Weete 1980) – dominierte (J.D. Weete, R. Furter, E. Hänseler und D.M. Rast, in Vorbereitung).

Ultrastrukturelle und biochemische Eigenschaften der Chitinsynthetase von *A. bisporus* und anderen Pilzen: ein Vergleich

Im Gegensatz zu der für den Fruchtkörper von *A. bisporus* beschriebenen Situation (wo nur proctoide Chitosomen gefunden worden sind : Bartnicki-Garcia et al. 1978) ist die morphologische Variation der Chitinsynthetase von Champignonmycelium ziemlich breit (Abb. 10), wie dies auch für die chitosomalen Präparationen von einigen anderen Pilzen gilt (ibid.). Zusätzlich zu proctoiden und zykloiden Chitosomen (Durchmesser 40-100 nm) wurden oftmals komplett sphärisch erscheinende, keinerlei Falten aufweisende Strukturen gefunden. Wir nennen sie sphäroide Chitosomen. Ähnliche, wenn nicht gar identische Partikel sind zwar auch auf von Bartnicki-Garcia et al. (1978) publizierten Bildern zu erkennen, wurden aber nicht von proctoiden Chitosomen unterschieden. Die fibroiden Gebilde ('fibroids': vgl. Bracker et al. 1976) und die langen, dünnen Fibrillen, welche von der Chitinsynthetase aus *A. bisporus* nach Inkubation mit Substrat und Aktivatoren gebildet werden (Abb. 11), sind denjenigen entsprechend behandelter chitosomaler Präparationen von *M. rouxii*, *B. emersonii* und anderen Pilzen (Bartnicki-Garcia et al. 1978; Mills & Cantino 1981) sehr ähnlich. Der Ursprung der in einigen Chitosomen vorhandenen, ca. 30 nm messenden, runden Partikel (Abb. 10e und 11a) ist unbekannt. Da deren Inneres nicht kontrastiert war, müsste es sich um eine kompakte Struktur oder um eine Vesikel mit intakter, möglicherweise durch Invagination der chitosomalen Schale gebildeten Membran handeln. Ähnliche Partikel wurden auch in analogen Enzympräparationen von *B. emersonii* (Mills & Cantino 1981) und *M. rouxii* (vgl. Bartnicki-Garcia et al. 1978) gefunden. Im Gegensatz dazu waren die in mit Trypsin aktivierten Chitosomen eingeschlossenen Körper im Innern jedoch kontrastiert (ibid.).

Wie von den meisten anderen Chitinsynthetasen bekannt (vgl. Gooday 1978 und darin zitierte Literatur), zeigt auch

das Enzym aus *A. bisporus* nur nach Behandlung mit einer Protease nennenswerte Aktivität. Die Tatsache, dass die chitosomale Chitinsynthetase von *M. rouxii* am besten durch eine saure Protease von *Rhizopus chinensis* (Ruiz-Herrera & Bartnicki-Garcia 1976) oder Rennilase (aus *M. miehei*) aktiviert wird – wobei letztere ihrerseits praktisch keinen Effekt auf das entsprechende Enzym von *A. bisporus* aufweist –, und dass Trypsin (die zur Stimulation von Chitinsynthetase weitaus am häufigsten verwendete Protease) auf Chitinsynthetase aus dem Champignon nur in einem engen Konzentrationsbereich wirksam ist (Abb. 15), deutet auf die Existenz verschiedener Typen von Chitinsynthetasen hin, die in vivo einer Kontrolle durch ziemlich spezifische Proteasen unterworfen wären. Dass Pronase, die unspezifischste aller Proteasen repräsentierend (Narahashi 1970), die beste stimulatorische Wirkung zeitigte (Abb. 15), kann nicht als ein Hinweis auf eine einfache Demaskierung des Enzyms durch Hydrolyse von Bindungen zwischen dem Enzym und anderen Proteinen der chitosomalen Schale interpretiert werden, da die durch Dissoziation von Chitosomen gewonnene 16 S-Chitinsynthetase immer noch zymogen ist (vgl. Abb. 22 sowie unten).

Stimulation der mycelialen Chitinsynthetase von *A. bisporus* durch GlcNAc (das – soweit bekannt – nicht in das Produkt eingebaut wird: vgl. Glaser & Brown 1957; McMurrough & Bartnicki-Garcia 1971; Gooday & de Rousset-Hall 1975), Nicht-Embarkeit des Enzyms selbst bei hoher Konzentration des Zuckers (80 mM), Erhaltung der sigmoiden Sättigungskurve auch in Anwesenheit einer sättigenden Konzentration von GlcNAc (nicht publiziert) und der numerische Wert des Hill-Koeffizienten (1,7) zeigen, dass das chitosomale Enzym von *A. bisporus* mindestens zwei klassische Regulationsmechanismen aufweist, positive Kooperativität und Allosterie, wie auch für das Enzym aus *C. cinereus* (de Rousset-Hall & Gooday 1975) postuliert. Dies gilt nicht nur für den 95 S-Enzym-Komplex, sondern auch für 16 S-Chitinsynthetase (s. unten).

Aus Tab. 5 ist ersichtlich, dass die prozentuale Verteilung der einzelnen Lipidklassen am Totallipid aus Chitosomen von derjenigen des mycelialen Lipids nicht signifikant verschieden ist. Auffällig erscheint der höhere Sättigungsgrad der Fettsäuren der chitosomalen Fraktion, die gegenüber dem mycelialen Lipid durch einen erhöhten Anteil an Palmitin- und Stearinsäure und einen geringeren Gehalt an ungesättigten Komponenten (Oel- und Linolsäure) ausgezeichnet ist. Die Frage, inwieweit die hier gefundenen Unterschiede funktionelle Bedeutung haben, kann erst nach einer weiteren Reinigung der Chitinsynthetase-Präparation beantwortet werden. Ebenfalls unklar ist, ob die in der Lipidzusammensetzung der Chitosomen von Hefezellen von *M. rouxii* (Hernandez et al. 1981) und von mycelialen Hyphen von *A. bisporus* (vgl. Abschnitt III/E) gefundenen Unterschiede Ausdruck eines unterschiedlichen Reinheitsgrades der untersuchten Fraktion oder ein artspezifisches Charakteristikum sind.

Dissoziation von Chitosomen und Bestimmung von Charakteristika der 16 S-Chitinsynthetase

Eine unter Einfluss von Digitonin erfolgende Dissoziation von Chitosomen in kleinere Partikel (16 S) mit Chitinsynthetase-Aktivität wurde bis jetzt nur für das Enzym aus Hefezellen von *M. rouxii* beschrieben (Ruiz-Herrera et al. 1980). Obwohl dies von den Autoren nicht besonders hervorgehoben wurde, dürfte es sich, dem Isolationsprozedere entsprechend, bei der sog. 'solubilisierten' Chitinsynthetase von *C. cinereus* (Gooday & de Rousset-Hall 1975) und *S. cerevisiae* (Duran & Cabib 1978) ebenfalls um 16 S-Chitinsynthetase handeln. Die Evidenz für die Annahme, wonach die nach Digitoninbehandlung von chitosomaler Chitinsynthetase in der 16 S-Fraktion vorhandenen Partikel tatsächlich die Chitin synthetisierenden Einheiten des dissoziierten Enzyms darstellen, ist bis jetzt indirekt geblieben, da physische Verbindung zwischen dem Produkt und den präsumptiven chitosomalen Untereinheiten nicht gezeigt wurde (Ruiz-Herrera et al. 1980). Dies zu beweisen, erschien notwendig, da chitosomale Präparationen morphologisch heterogen sind (vgl. Abb. 10 und Abschnitt III/C.1), die Grösse der in der 16 S-Fraktion von mit Digitonin be-

handelten chitosomalen Präparationen vorhandenen Partikel stark variiert (Abb. 21; Ruiz-Herrera et al. 1980), und da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den durch Behandlung von chitosomaler Chitinsynthetase mit Digitonin gebildeten Partikeln um Saponin-Micellen mit ähnlichem Sedimentationsverhalten wie sphäroide 16 S-Partikel handelte (MG ca. $4 \cdot 10^5$; vgl. Smith & Pickels 1940). Die in Abb. 21 dargestellten Resultate erbringen nun den geforderten Beweis.

Im Gegensatz zum Produkt der chitosomalen Chitinsynthetase von *Agaricus* (Abb. 11) und auch von anderen Pilzen (Bartnicki-Garcia et al. 1978) sind die von den chitosomalen Untereinheiten gebildeten Fibrillen extrem dünn und auf ihrer ganzen Länge von einheitlicher Dicke. Die dünnsten nach Inkubation von aktivierter 16 S-Chitinsynthetase beobachteten Fibrillen waren ca. 1 nm dick (Abb. 21) – ein Wert, der nahe an dem durch die experimentelle Anordnung vorgegebenen Auflösungsvermögen liegt, das unter anderem durch die Dicke der Probe und die Korngrösse des Kontrastierungsmittels bestimmt wird. Einige Fibrillen schienen noch dünner zu sein; genaue Messungen waren aber nicht möglich. Solche dünnen Fibrillen können somit offensichtlich nur dort beobachtet werden, wo der Trägerfilm ausnehmend dünn ist. Unter Berücksichtigung des von Carlström (1957) vorgeschlagenen Modells für α -Chitin – die in *Agaricus* (s. Abb 8) und anderen Pilzen (vgl. Muzzarelli 1977) gefundene Form des Polymers – besteht eine Fibrille von 1 nm Dicke wahrscheinlich aus zwei molekularen Ketten. Die längsten von 16 S-Untereinheiten gebildeten Fibrillen waren 2 μ m lang, ein Wert der aber sicherlich ein Minimum repräsentiert, da die Fibrillen oft durch den Rand des Gesichtsfeldes abgeschnitten waren. Die in dieser Arbeit gefundenen Werte für die Länge und Breite der von 'solubilisierter' Chitinsynthetase gebildeten Fibrillen scheinen

auf den ersten Blick im Gegensatz zu früheren Berichten zu stehen, in denen das Produkt dieses Enzyms als rhomboide Partikel (60 nm lang und 10 nm breit; Duran & Cabib 1978) oder als laterales Aggregat von kurzen, nadelförmigen Segmenten mit ähnlichen Dimensionen (Ruiz-Herrera et al. 1980) beschrieben wurde. Wahrscheinlich dürfte die zu lange Inkubationszeit (30 min-24 h) für dieses Resultat verantwortlich sein, bilden doch Präparationen von 16 S-Chitinsynthetase aus *Agaricus* ähnliche Fibrillen und Netzwerke wie vergleichbare Präparationen aus *Mucor*, sobald die Inkubationszeit 10 min (oder länger) beträgt.

Die Assoziation eines beträchtlichen Teiles der Chitinsynthetase-Aktivität von mit Digitonin behandelten chitosomalen Präparationen mit der 95 S-Fraktion (Abb. 20) deutet an sich darauf hin, dass die Dissoziationsbedingungen nicht optimal waren; Ruiz-Herrera et al. (1980) interpretieren die analogen Beobachtungen ebenso. Allerdings müsste dann der Zerfall des Chitosoms unter Einfluss des Detergens' ein ausserordentlich delikater Prozess sein, ergab sich doch selbst durch breite Variation der vier Parameter Digitonin/Sterol-Verhältnis, absolute Saponinkonzentration, Inkubationsdauer und Digitoninkonzentration im zur Reinigung der Untereinheiten verwendeten Saccharosedichtegradienten keine wesentliche Verbesserung der relativ geringen Ausbeute an aktiven 16 S-Einheiten. Es erscheint jedoch, dass das Saponin neben der Dissoziation der Chitosomen auch eine Hemmung der Aktivität der so freigesetzten 16 S-Untereinheiten bewirkt. Diese Annahme wird durch die folgenden experimentellen Fakten gestützt : (i) Verdünnung von dissoziierter Chitinsynthetase (in 0,1% Digitonin) führt zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität (Ruiz-Herrera et al. 1980); (ii) umgekehrt wird die Aktivität isolierter 16 S-Chitinsynthetase (in 0,1% Digitonin: vgl. Abb. 20, Peakfraktionen 9-11) durch weitere Erhöhung der Saponinkonzentration gehemmt (vgl. Tab. 4); (iii) isolierte chitosomale Untereinheiten sind gegenüber Digitonin sensib-

lerals Chitosomen (vgl. Ruiz-Herrera et al. 1980: 50% bzw. 80% Inhibition der Aktivität von Chitosomen resp. chitosomalen 16 S-Untereinheiten von *Mucor* durch 0,05% Digitonin); (iv) aus dem durch Zentrifugieren bei hohen g-Zahlen gewonnenen Ueberstand von Chitosomenpräparationen, welche mit höheren als der Dissoziation hervorrufenden Konzentration von Digitonin behandelt worden sind, kann nach Pelletieren der präsumptiven 16 S-Partikel – und somit gleichzeitiger Entfernung des Saponins – aktive Chitinsynthetase gewonnen werden (vgl. Tab. 3). Die Annahme erscheint deshalb als zwingend, dass das Unvermögen, nach Inkubation von Chitosomen bei hohen Konzentrationen von Digitonin aktive Chitinsynthetase nachzuweisen, nicht ein Ausbleiben der Dissoziation anzeigt, sondern auf einer unter diesen Umständen kompletten Inhibition der chitosomalen 16 S-Untereinheiten nach deren Freisetzung beruht.

Ruiz-Herrera et al. (1980) haben schon früher postuliert, dass die Hemmung der mittels Digitonin dissoziierten Chitinsynthetase auf einer Komplexbildung zwischen dem Saponin und einem Sterol, das für die Funktion des Enzyms essentiell wäre, beruhen könnte. Die Hemmung sowohl des chitosomalen Enzyms (Rast & Bartnicki-Garcia 1981; Hänseler et al. 1983) als auch der 16 S-Chitinsynthetase (vgl. Resultate) durch Amphotericin B-methylester, welcher ja wie Digitonin eine Sterol komplexierende Substanz repräsentiert, könnte im gleichen Sinne interpretiert werden. Da es sich bei beiden Substanzen, dem Saponin und dem Polyen, um lipidgebundene Zucker handelt, haben diese neben der Fähigkeit, Sterole zu binden, aber eine weitere gemeinsame Eigenschaft, welche für die Interaktion mit der Chitinsynthetase relevant sein könnte.

Die Beobachtung, wonach aus der Wand- und der 'mixed membrane'-Fraktion nach Entfernen der mit Puffer extrahierbaren Chitosomen durch Behandlung mit Digitonin über einen relativ breiten Konzentrationsbereich (Hänseler, nicht publiziert) aktive 16 S-Partikel gewonnen werden können, wirft die Frage auf, ob diese durch Dissoziation von Chitosomen gebildet werden oder in den betreffenden Kompartimenten als solche vorliegen und durch das Detergens bloss extrahiert werden.

Die unterschiedliche Reaggregationsfähigkeit - und somit das Vorliegen struktureller Unterschiede zwischen Chitin synthetisierenden 16 S-Partikeln aus Chitosomen einerseits und der Wand- und der 'mixed-membrane'-Fraktion andererseits - würde für die zweitgenannte Möglichkeit sprechen.

Neben der Zymogenität (Ruiz-Herrera et al. 1980) und potentiellen Kontrolle ihrer Aktivität durch eine endogene Chitinase (Lopez-Romero et al. 1982) sind bisher keine regulatorischen Eigenschaften der 16 S-Chitinsynthetase bekannt geworden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate - alle Experimente mit Pools von mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten Chitin synthetisierenden 16 S-Partikeln durchgeführt - bestätigen die Zymogenität des Enzyms. Die auffällige Sigmoidizität der Kurve (Abb. 22) Enzymaktivität = f(Pronase-Konzentration) induziert sicherlich die Frage, inwieweit die Verfügbarkeit einer Protease ein regulatorischer Faktor der Enzymaktivität in vivo sein könnte. Hierüber ist jedoch praktisch nichts bekannt (vgl. Cabib 1981). Ferner zeigen die Resultate die Erhaltung des homotrop- heterotropen Regulationstyps, mit UDPGlcNAc und GlcNAc als Modulatoren, nach der Dissoziation der chitosomalen Chitinsynthetase in aktive Subpartikel (Abb. 22b-c). Demzufolge ist die positive Kooperativität zwischen zwei Bindungsstellen für das Substrat nicht das Resultat einer Interaktion von 16 S-Untereinheiten untereinander, sondern eine inhärente Eigenschaft dieser selbst. Ob die beiden Modulatoren an zwei verschiedenen Stellen an das Enzym binden, kann auf Grund der vorliegenden Resultate nicht entschieden werden; die Erhaltung der sigmoiden Kinetik selbst in der Gegenwart einer sättigenden Konzentration von GlcNAc (Abb. 22b) und die ausbleibende Hemmung der Enzymaktivität selbst bei sehr hohen GlcNAc-Konzentrationen (50 mM: nicht publiziert) würden jedoch - im Gegensatz zu einer Hypothese von Ruiz-Herrera et al. (1977) - dafür sprechen, dass dies der Fall ist.

Die beobachtete Erniedrigung der $K'_{m,app}$ -Werte für UDPGlcNAc und GlcNAc (vgl. Abb. 22b-c und Hänseler et al. 1983) sowie die verglichen mit dem chitosomalen Enzym höhere Suszeptibilität der 16 S-Chitinsynthetase auf proteolytische Aktivierung (Abb. 22a) und auf Amphotericin B-methylester (vgl. Resultate) kommen wohl durch eine verbesserte Zugänglichkeit der entsprechenden Bindungsstellen als Folge der Entfernung der Membran durch das Saponin zustande.

Rekonstitution von Chitosomen aus isolierter 16 S-Chitinsynthetase

Im Gegensatz zu Experimenten von Bartnicki-Garcia et al. (1979), in denen die Reaggregation von mit Digitonin dissoziierter Chitinsynthetase in eine heterogene Population membranähnlicher, teilweise vesikulärer Strukturen mit S-Werten, die grösser als diejenigen von 16 S-Partikeln aber kleiner als diejenigen von Chitosomen waren, erfolgte, konnte in dieser Arbeit erstmals Reaggregation von isolierter 16 S-Chitinsynthetase zu einer bezüglich Ultrastruktur als auch Sedimentationsverhalten im Dichtegradienten mit Chitosomen übereinstimmenden Population von Partikeln gezeigt werden (vgl. Abb. 10 und 26). Allerdings führte dieser Reaggregationsprozess vorwiegend zu 'schweren' Chitosomen (d.h. mit einem mittleren S-Wert der grösser als derjenige der Peakfraktion von Standardchitosomen ist). Ob es sich bei diesem Phänomen um eine Rekonstitution nur von solchen 16 S-Partikeln, die bereits in 'schweren' Chitosomen lokalisiert waren, oder um einen Artefakt handelt, kann aufgrund vorliegender Daten nicht entschieden werden. Anders als die Dissoziation scheint die Rekonstitution ein wenig komplexer Vorgang zu sein, da bei der Zentrifugation einer mit Digitonin behandelten chitosomalen Präparation in einen saponinfreien Gradienten Zwischenformen (sowohl bzgl. Sedimentationsverhalten als auch Ultrastruktur) gebildet wurden (Abb. 23 und 24). Die Fähigkeit von reaggregierten Chitosomen, Aggregaten von 16 S-Par-

tikeln sowie schliesslich auch von freien 16 S-Untereinheiten zur Fibrillogenese (Abb. 21, sowie unveröffentlichte Resultate von E. Hänseler, L.E. Nyhlén und D.M. Rast) zeigt, dass diese im Prinzip unabhängig von einer allfälligen Integration der synthetisierenden Partikel in eine membranähnliche Struktur erfolgt. Reaggregation in Chitin synthetisierende Partikel mit S-Werten von ca. 130 erfolgte nicht nur mit 16 S-Einheiten aus Chitosomen, sondern auch mit solchen aus Wänden, wobei diese allerdings eine geringere Rekonstitutionsfähigkeit aufweisen als chitosomale Subpartikel. Aus Abb. 23 geht hervor, dass bei der Zentrifugation einer mit Digitonin inkubierten *chitosomalen* Fraktion – im Gegensatz zu der von Bartnicki-Garcia et al. (1979) beschriebenen Situation – nur sehr wenig 16 S-Enzymaktivität nachweisbar ist. Das Experiment dieser Autoren konnte nur dann nachvollzogen werden, wenn *aus Wänden* gewonnene 16 S-Chitinsynthetase als Ausgangsmaterial diente (Abb. 27). Diese Ergebnisse zeigen somit die Existenz struktureller Unterschiede zwischen 16 S-Chitinsynthetase-Partikeln verschiedener intrazellulärer Lokalisation auf, die dadurch zustande kommen könnten, dass das chitosomale Enzym, eine stabile Transportform vom Ort der Synthese zum Ort der Fibrillogenese repräsentierend (Bracker et al. 1976), in der Zellmembran oder im periplasmatischen Raum unter chemischer Modifikation (Uy & Wold 1977; Krebs & Beavo 1979) in 16 S-Untereinheiten zerfällt.

Rekonstitution von Chitosomen aus isolierter 16-S-Chitinsynthetase stellt, – wenn die Ausbeute gesteigert werden kann – einen eleganten Weg zur Herstellung hoch gereinigter Chitinsynthetase dar, da die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass beim Dissoziationsprozedere andere allenfalls in der chitosomalen Präparation vorhandene Partikel Untereinheiten bilden, die sowohl einen Sedimentationskoeffizienten von 16 als auch die Fähigkeit zur Reaggregation zu Gebilden mit S-Werten von ca. 90-150 aufweisen. Rekonstituierte Chitosomen stellen daher die reinste Form der bisher beschriebenen Chitinsynthetasepräparationen dar.

Modulation der Chitinsynthetase-Aktivität durch Antibiotika

Die Tatsache, dass die myceliale Chitinsynthetase aus *A. bisporus* wie diejenige aus Hefezellen von *M. rouxii* und aus anderen Pilzen (vgl. Müller et al. 1981 und darin zitierte Arbeiten) durch Nikkomycine stark gehemmt wird, stimmt mit dem schon aus mechanistischen Gründen erhobenen Postulat eines sowohl phylogenetisch als auch ontogenetisch streng konservativen Verhaltens des Enzyms überein (vgl. Bartnicki-Garcia 1970 und Gooday 1978). Die Korrektheit dieser Annahme wird noch dadurch unterstrichen, dass die K_i -Werte für die Nikkomycine X und Z in den beiden bisher getesteten Systemen (Müller et al. 1981; Hänseler et al. 1983) praktisch identisch sind. Dies gilt auch für Amphotericin B-methylester (AME) : der hier bestimmte K_i -Wert ist demjenigen der Chitinsynthetase aus Hefezellen von *M. rouxii* gleich (Furter 1980).

Alle getesteten Antibiotika beeinflussten die Chitinsynthetase-Aktivität im gleichen Konzentrationsbereich. Im Gegensatz zu AME und α -Tomatin war die Stimulation der Enzymaktivität durch Digitonin jedoch immer wesentlich ausgeprägter und zwar etwa 6x grösser als der von Ruiz-Herrera et al. (1980) angegebene Wert. Da das Hyphenspitzenwachstum auf einem subtilen Wechselspiel der Aktivitäten von Wandkomponenten synthetisierenden bzw. hydrolysierenden Enzymen besteht, und da die MIC-Werte von Digitonin bei Chitin bildenden Pilzen in derselben Größenordnung liegen (Wulff 1968, Tschesche & Wulff 1973) wie die Konzentrationen, die maximale Stimulation der Chitinsynthetase bewirken (Hänseler et al. 1983), scheint die Möglichkeit gegeben, dass dieses Phänomen mindestens teilweise für den antimykotischen Effekt von Digitonin verantwortlich ist. Bei der Suche nach der molekularen Grundlage der stark stimulierenden Wirkung von Digitonin auf die Chitinsynthetase können vier Möglichkeiten in Betracht gezogen werden : eine unspezifische Saponinwirkung auf das Chitosom (i); ein spezifischer Saponineffekt (ii); eine Er-

höhung der Zugänglichkeit des Substrates zum Enzym als Folge einer durch das Saponin bewirkten Dissoziation desselben (Ruiz-Herrera et al. 1980) (iii); und Bildung eines Sterol/Digitonin-Komplexes und dadurch Beeinflussung eines Sterols, das an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt sein könnte (ibid.) (iv). Gegenargumente zu den erwähnten Thesen sind : (i) Stimulation der Chitinsynthetase scheint kein allgemeines biochemisches Korrelat von Detergentien zu sein, bewirken doch Lauryldimethylaminoxid und Octylglucopyranosid lediglich Hemmung des Enzyms; (ii) die nur geringe Stimulation durch α -Tomatin (Abb. 17) stimmt mit einer spezifischen Saponinwirkung nicht überein; (iii) die Dissoziation der Chitosomen aus *A. bisporus* erfolgt bei signifikant höheren Digitoninkonzentrationen als denjenigen, die maximale Stimulation hervorrufen; (iv) der stimulierende Effekt von AME und anderen Polyenmakrolidantibiotika (Rast & Bartnicki-Garcia 1981; Rast et al. 1981b), die ja alle mit Sterolen stabile Komplexe bilden (Bittman 1978; Patterson et al. 1979), ist wesentlich geringer als derjenige von Digitonin. Die Aufklärung der Interaktion Digitonin/chitosomale Chitinsynthetase in Begriffen von Struktur/Aktivität-Beziehungen wird im gegenwärtigen Zeitpunkt zusätzlich dadurch erschwert, dass kommerziell erhältliches Digitonin ein Gemisch verschiedener Saponine ist, sodass der beobachtete Effekt möglicherweise die Resultierende verschiedener Wirkungen darstellt. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass das aus *D. lanata* isolierte Saponin (vgl. III/C.3 – möglicherweise mehrheitlich Tigonin; L. Hösch pers. Mitteilung) – in allen applizierten Konzentrationen (bis 0,5%) keine inhibierende Wirkung zeigte, die Enzymaktivität aber bis zu 100% stimulierte (vgl. Abb. 18).

Modulation der Chitinsynthetase-Aktivität durch die Saponine Digitonin und α -Tomatin (Abb. 17) sowie die Polyene Nystatin und Amphotericin B (Rast & Bartnicki-Garcia 1981) sowie den Methylester des letztern (Furter 1980; Hänseler et al. 1983) könnte als Indiz dafür betrachtet werden, dass

Sterol eine wichtige, die Enzymaktivität kontrollierende Komponente der Chitinsynthetase darstellte, eine Möglichkeit, auf welche bereits Ruiz-Herrera et al. (1980) hingewiesen haben. Das Auftreten von Sterolen im chitosomalen Lipid sowohl von *M. rouxii* (Hernandez et al. 1981) als auch von *A. bisporus* (Tab. 5) wäre an sich mit dieser Auffassung kompatibel. Die folgenden Fakten und Erwägungen sprechen jedoch gegen diese These: (i) Zugabe von Ergosterol zu mycelialer Chitinsynthetase von *A. bisporus* beeinflusst die Enzymaktivität nicht (Hänseler, unveröffentlicht); (ii) Aetherextraktion der Chitosomen resultiert in einer Steigerung der Aktivität des Enzyms, was anzeigt, dass zumindest die Anwesenheit von solchen Sterolen, wie sie üblicherweise als Phospholipidaddukte auftreten, für die Enzymaktivität nicht essentiell ist; (iii) Inhibition der Chitinsynthetase durch Nystatin sowie durch Amphotericin B (Rast & Bartnicki-Garcia 1981) und dessen Methylester (Furter 1980; Hänseler et al. 1983), nicht jedoch durch die noch stärkeren Sterol-Komplexbildner Filipin und Pimaricin (vgl. Rast & Bartnicki-Garcia 1981), sowie Hemmung selbst der 16 S-Chitinsynthetase durch AME (vgl. Resultate) spricht ebenfalls gegen die Hypothese einer funktionellen Rolle der Sterole für die Modulation der Chitinsynthetase-Aktivität; (iv) obschon Digitonin/Sterol-Komplexe bei 4 °C recht stabil sind – ein Zerfall des Komplexes erfolgt erst durch starkes Erhitzen oder durch Applikation von organischen Lösungsmitteln – erfolgt durch Zentrifugation des mit Digitonin behandelten Enzyms in einen saponinfreien Gradienten, und somit zum mindesten partielle Entfernung des Saponins, sofortige Reaggregation der Untereinheiten (Abb. 23, 25, 27).

Ausblick

Wie einleitend erwähnt, stellt die Chitinsynthetase prinzipiell ein "Target" par excellence für Fungizide dar. Aufgrund der Resultate der vorliegenden Arbeit erscheint die

Bearbeitung der folgenden vier Problemstellungen für einen weiteren Fortschritt in der anvisierten Richtung als angezeigt :

- (1) Weitere Reinigung sowohl von Chitosomen als auch von 16 S-Chitinsynthetase (als notwendige Voraussetzung zu einem detaillierteren Studium der Lipidzusammensetzung der Chitosomen und 16 S-Subpartikel, der Identität des fest gebundenen "Primers" der Chitinsynthetase, der allfälligen Existenz eines "Lipid-Intermediate" als Bestandteil des Enzyms, der möglichen Funktion von Sterolen, des Vorkommens anderer Enzymaktivitäten als UDPGlcNAc: Chitin-GlcNAc-Glycosyltransferase und der Interaktion von Modulatoren wie GlcNAc, Protease u.a. Proteinen mit dem Enzym sowie zur Aufklärung der molekularen Organisation der 16 S-Untereinheiten);
- (2) Ermittlung der aktiven Molekülspezies von jenen Antibiotika - Mischungen strukturell sehr ähnlicher Substanzen darstellend -, welche sowohl die Chitinsynthese als auch das pilzliche Wachstum beeinflussen;
- (3) Studium von Struktur/Aktivitäts-Beziehungen in Spirostanolglykosid/ und Polyenmakrolidantibiotikum/Chitinsynthetase-Paaren, um so Informationen zu gewinnen, die für die gezielte Modifikation von Modulatoren der Enzymaktivität im Sinne einer Potentiierung ihrer biochemischen und somit potentiell auch ihrer antifungalen Effektivität von heuristischem Wert sein könnten;
- (4) Bereitstellung eines 'Screens' für Naturprodukte oder synthetische Substanzen mit antifungaler Aktivität, wobei insbesondere immobilisierte 16 S-Chitinsynthetase ein reagenierbares, von der Gegenwart stabilisierender Agentien unabhängiges Testsystem darstellen würde.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Chitinsynthetase-Präparationen aus *A. bisporus* erscheinen aus den folgenden Gründen zu diesem Zweck als besonders geeignet :

- (1) Das Enzym ist leicht aus auf vollsynthetischem Medium homogen kultivierbarem Mycelium zu gewinnen;

(2) Sowohl das chitosomale Enzym als auch die 16 S-Chitinsynthetase weisen spezifische Aktivitäten auf, die mit denjenigen aus anderen Organismen vergleichbar sind, und zeigen hohe Sensitivität auf bekannte fungitoxische, mit Chitinsynthetase interagierende Antibiotika;

(3) Aus Chitosomen isolierte und gereinigte 16 S-Untereinheiten stellen die bisher einzigen Partikel dar, welche die Fähigkeit zur Rekonstitution von membranfreier chitosomaler Chitinsynthetase besitzen.

Schliesslich zeigt die weite Verbreitung von Chitin nicht nur in den Pilzen, sondern auch bei Invertebraten (vor allem den Mollusken, Arthropoden, Anneliden sowie Nematoden (vgl. Rudall 1955) und vielleicht auch bei den Protozoen (s. Muzzarelli 1977; Arroyo-Begovitch & Carabez-Trejo 1982)), die Möglichkeit auf, pilzliche Chitinsynthetase als ein Testsystem zum Auffinden von Produkten zur Therapie von durch Vertreter dieser Taxa hervorgerufenen Krankheiten von Vertebraten einzusetzen. Eine analoge Auffassung ist bereits von Brillinger (1979) für die Suche nach in der Agrikultur verwendbaren Insektiziden vertreten worden. Der offenbar hohe Grad an struktureller Uebereinstimmung von aus Pilzen resp. Insekten isolierter Chitinsynthetase (Cohen & Casida 1980; Cohen 1982) stellt nun einerseits zwar eine wesentliche Stütze für die formale Richtigkeit dieses Konzeptes dar, stellt aber andererseits aus ökologischen Erwägungen seine praktische Durchführung in Frage, falls im konkreten Fall der Schädling nicht eine besonders hohe Suszeptibilität auf das Fungizid aufweist und/oder bei den betreffenden Nützlingen nicht ein hoher Grad von Unzugänglichkeit des "Targets" – die biochemisch oder entwicklungsphysiologisch bedingt sein kann – vorliegt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Auf einem synthetischen Medium und – im Gegensatz zu den meisten der bisher kultivierten filamentösen Pilzen – in homogener, pellet-freier Submerskultur gezogenes Mycelium des Kulturchampignons *A. bisporus* wurde bezüglich der Zusammensetzung seiner Hyphenwand sowie der Lipidfraktion untersucht und diente als Ausgangsmaterial zur Isolation von Präparationen des Chitin synthetisierenden Miniorganells (Chitosom). Ferner wurden die ultrastrukturellen Charakteristika, die kinetischen und regulatorischen Eigenschaften sowie die Modulation des chitosomalen Enzyms und der in Gegenwart von Digitonin daraus gebildeten 16 S-Subpartikel durch einige antifungale Agentien analysiert. Die Isolation grösserer Pools gereinigter 16 S-Chitinsynthetase erlaubte es schliesslich, Präparationen von rekonstituierten, aktiven Chitosomen zu gewinnen, die wegen der Abwesenheit sowohl von Membran als auch Detergens ein für das Studium der Fibrillogenese von Chitin in vitro besonders geeignetes Experimentalsystem darstellen. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lauten :

In Flüssigkultur gezogenes Champignonmycelium enthält im Vergleich zu auf Festagar oder Kompost gewachsenem Pilzmaterial einen höheren Anteil an polaren Lipiden, und die in den einzelnen Fraktionen auftretenden Fettsäuren weisen einen geringeren Sättigungsgrad auf ($C_{18:1} : C_{18:2} = 1,25-1,86$ in der Phospholipid- resp. der freien Fettsäure-Fraktion). Der Nachweis von Phosphatidylcholin, das übrigens eine Hauptkomponente der Phospholipid-Fraktion darstellt, erlaubt es, die diesbezüglichen Kontroversen als erledigt zu betrachten. Ergosterol stellt erwartungsgemäss die Hauptkomponente der Sterolfraktion dar. Die mittels Röntgendiffraktometrie, IR-Spektroskopie und spezifischen enzymatischen Tests analysierten drei wichtigsten Komponenten der Zellwand sind (Werte in % des Trockengewichtes der Wand) : α -1,3-Glucan ($8,9 \pm 0,7\%$), β -1,3(β -1,6)-Glucan ($23,5 \pm 2,7\%$) und Chitin ($28,6 \pm 3,8\%$).

Die myceliale Chitinsynthetase von *A. bisporus* zeigt Akti-

vitäten, die mit denjenigen von Hefe-Zellen von *M. rouxii*, dem bisherigen Standardsystem zur Isolation chitosomaler Chitinsynthetase, vergleichbar sind. Zudem besteht nicht nur biochemisch sondern auch ultrastrukturell eine grundlegende Übereinstimmung zwischen dem hier untersuchten Enzym und der chitosomalen Chitinsynthetase von diesem Organismus und anderen Pilzen. Zusätzlich zur zykliden und proctoiden Form des Organells (Bracker et al. 1976) wurde allerdings noch ein sphäroider Typ unterschieden. Mit Substrat und Aktivatoren der Chitinsynthetase (UDPGlcNAC resp. Mg^{2+} , GlcNAC und Pronase) inkubierte Chitosomen bilden – unter Oeffnung ihrer Schale – lange, dünne, als Chitin identifizierte Fibrillen. Die untersuchte chitosomale Chitinsynthetase zeigt nur nach proteolytischer Aktivierung nennenswerte Aktivität (wobei eine gewisse Spezifität gegenüber verschiedenen Proteasen vorliegt), weist einen homotropen/heterotropen Typ der Regulation, mit UDPGlcNAC und GlcNAC als Modulatoren, auf, und die mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmte Sedimentationskonstante der Partikel der Peakfraktion beträgt 95 S.

Das Enzym wird durch die antifungalen Agentien Nikkomycin und Amphotericin B-methylester gehemmt ($K_i = 1,5 \mu M$ resp. 0,1 mM). Auch Digitonin interferiert mit der chitosomalen Chitinsynthetase : in niedrigen Konzentrationen stimuliert es die Enzymaktivität (bis 300%), in höheren inhibiert es sie. Die unter Einfluss von Digitonin aus Chitosomen gebildeten Subpartikel (10-20 nm) haben ein MW von ca. 500'000, weisen eine Sedimentationskonstante von 16 S auf und bilden nach Inkubation mit Substrat und Aktivatoren (s. oben) lange, dünne Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von ca. 1 nm. Entsprechend dem Carlström'schen Modell für α -Chitin besteht eine solche Fibrille demnach aus vier molekularen Chitinketten. Die 16 S-Chitinsynthetase stimmt bezüglich ihrer kinetischen und regulatorischen Eigenschaften im wesentlichen

mit dem chitosomalen Enzym überein : $K_m \text{ UDPGlcNAc} = 0,5 \text{ mM}$;
 $K_m \text{ GlcNAc} = 0,8 \text{ mM}$; $n_h > 1$; Hemmbarkeit durch Amphotericin
B-methylester und Digitonin. Die 16 S-Partikel haben min-
destens zwei Bindungsstellen für das Substrat, woraus hervor-
geht, dass das positiv kooperative Verhalten der chitosomalen
Chitinsynthetase in den 16 S-Subpartikeln und nicht zwischen
solchen ablaufende Vorgänge betrifft. Chitin synthetisieren-
de 16 S-Untereinheiten können auch durch Extraktion von Wand-
und 'mixed-membrane'-Fraktionen mit Digitonin (0,1-0,5%) er-
halten werden. Im Unterschied zur Extraktion von 16 S-Chitin-
synthetase aus Wänden stellt die Dissoziation von Chitosomen
in aktive Untereinheiten einen sehr präzise kontrollierten
Vorgang dar, tritt er doch nur bei einer ganz bestimmten Digi-
toninkonzentration (0,1%) auf. Es wird eine Hypothese präsen-
tiert, wonach auch bei Anwendung höherer Saponinkonzentration-
en 16 S-Partikel freigesetzt werden, deren enzymatische Ak-
tivität aber zu 100% gehemmt ist.

Durch Entfernung des Digitonins kann isolierte 16 S-
Chitinsynthetase zu Partikeln rekonstituiert werden, die sich
biochemisch nur insofern von nativen Chitosomen (95 S) unter-
scheiden, als sie einen höheren mittleren Sedimentations-
koeffizienten aufweisen (130 S). Da sich die durch Extraktion
mit Digitonin aus Wänden gewonnenen 16 S-Partikel von den durch
Dissoziation von Chitosomen entstehenden durch eine schlech-
tere Reaggregationsfähigkeit unterscheiden, muss das wand-
gebundene 16 S-Enzym chemisch modifiziert sein. Es wird die
potentielle Bedeutung dieses Befundes für die in vivo-Situa-
tion diskutiert.

Dank

Mein herzlicher Dank richtet sich in erster Linie an Frau Prof. Dr. Rast für die intensive Betreuung, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, den Einblick in die interessante Thematik des pilzlichen Stoffwechsels und den grossen Einsatz, den sie bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit sowie zweier daraus hervorgegangener Publikationen geleistet hat.

Herrn Rolf Furter möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit und Fräulein Ursula Moser für die Reinschrift dieses Manuskriptes herzlich danken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. J.H. Sietsma, Universität Groningen, Holland, für die Durchführung röntgendiffraktometrischer Untersuchungen und einiger Zellwandanalysen, während den Herren Prof. Dr. H.R. Oswald und Dr. H.R. Beer, Anorganisch-Chemisches Institut Universität Zürich, für die Hilfe bei der Röntgendiffraktometrie und Densitometrie Dank gebührt.

Mein Dank richtet sich schliesslich auch an Prof. H. Zähler, Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen, für die Ueberlassung von Nikkomycin X und Z, an Dr. L. Nyhlén für die elektronenmikroskopischen Arbeiten, Dr. H.P. Ruffner für die Hilfe bei der Lösung technischer und biochemischer Probleme und an die Schweizerische Ferment AG, Basel, welche die Rennilase zur Verfügung stellte.

Die vorliegende Arbeit wurde dank der finanziellen Beiträge des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 3.576-0.79) ermöglicht.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ARROYO-BEGOVITCH, A., AND CARABEZ-TREJO, A. 1982. Location of chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. J. Parasitol. 68 : 253-258.
- BARLETT, G.R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234 : 466-468.
- BARTNICKI-GARCIA, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol. 22 : 87-108.
- BARTNICKI-GARCIA, S. 1970. Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In *Phytochemical Phylogeny* (J.B. Harborne, Ed.), pp. 81-103. Academic Press, London/New York.
- BARTNICKI-GARCIA, S. 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. pp. 245-261. Symposium Society of General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- BARTNICKI-GARCIA, S., AND NICKERSON, W.J. 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. J. Bacteriol. 84 : 841-858.
- BARTNICKI-GARCIA, S., AND REYES, E. 1964. Chemistry of spore wall differentiation in *Mucor rouxii*. Arch. Biochem. Biophys. 108 : 125-133.
- BARTNICKI-GARCIA, S., BRACKER, C.E., REYES, E., AND RUIZ-HERRERA, J. 1978. Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrills. Exp. Mycol. 2 : 173-192.
- BARTNICKI-GARCIA, S., RUIZ-HERRERA, J., AND BRACKER, C.E. 1979. Chitosomes and chitin synthesis. In *Fungal Walls and Hyphal Growth* (J.H. Burnett and A.P.J. Trinci, Eds.), pp. 149-168. Cambridge University Press, Cambridge/London/New York/Melbourne.

- BERAN, K., HOLAN, Z., AND BALDRIAN, J. 1972. The chitin-glucan complex in *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiol. 17 : 322-330.
- BITTMAN, R. 1978. Sterol-polyene antibiotic complexation: probe of membrane structure. Lipids 13 : 686-691.
- BRACKER, C.E., RUIZ-HERRERA, J., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 : 4570-4574.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- BRILLINGER, G.U. 1979. Metabolic products of microorganisms 181. Chitin synthase from fungi, a test model for substances with insecticidal properties. Arch. Microbiol. 121 : 71-74.
- BULL, A.T. 1970. Chemical composition of wild-type and mutant *Aspergillus nidulans* cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. J. Gen. Microbiol. 63 : 75-94.
- BURNETT, J.H. 1976. *Fundamentals of Mycology*, 2nd edition. Edward Arnold, London.
- BURNETT, J.H. 1979. Aspects of the structure and growth of hyphal walls. In *Fungal Walls and Hyphal Growth* (J.H. Burnett and A.P.J. Trinci, Eds.), pp. 1-25. Cambridge University Press, Cambridge/London/New York/Melbourne.
- BYRNE, P.F.S., AND BRENNAN, P.J. 1975. The lipids of *Agaricus bisporus*. J. Gen. Microbiol. 89 : 245-255.

- CABIB, E. 1981. Chitin: structure, metabolism, and regulation of biosynthesis. In *Plant Carbohydrates II*. (W. Tanner and F.A. Loewus, Eds.) *Encycl. Plant Physiol. N.S.*, Vol. 13B, pp. 395-415. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- CABIB, E., DURAN, A., AND BOWERS, B. 1979. Localized activation of chitin synthetase in the initiation of yeast septum formation. In *Fungal Walls and Hyphal Growth* (J.H. Burnett and A.P.J. Trinci, Eds.), pp. 189-201. Cambridge University Press, Cambridge/London/New York/Melbourne.
- CARLSTROEM, D. 1957. The crystal structure of α -chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3 : 669-683.
- COCHRAN, T.W., AND VERCELLOTTI, J.R. 1978. Hexosamine biosynthesis and accumulation by fungi in liquid and solid media. *Carbohydr. Res.* 67 : 529-543.
- COHEN, E. 1982. In vitro chitin synthesis in an insect: formation and structure of microfibrils. *Eur. J. Cell Biol.* 16 : 289-294.
- COHEN, E., AND CASIDA, J.E. 1980. Inhibition of *Tribolium* gut chitin synthetase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13 : 129-136.
- DAEHN, U., HAGENMAIER, H., HOEHNE, H., KOENIG, W.A., WOLF, G., UND ZAEHNER, H. 1976. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. *Arch. Microbiol.* 107 : 143-160.
- DE ROUSSET-HALL, A., AND GOODAY, G.W. 1975. A kinetic study of a solubilized chitin synthetase preparation from *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* 89 : 146-154.

- DIXON, M. 1953. Determination of K_i . Biochem. J. 55 : 170-171.
- DREYWOOD, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. Industr. Engng. Anal. Edit. 78 : 499.
- DURAN, A., AND CABIB, E. 1978. Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. J. Biol. Chem. 253 : 4419-4425.
- DURAN, A., BOWERS, B., AND CABIB, E. 1975. Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 3952-3955.
- ELSON, L.A., AND MORGAN, W.T. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. Biochem. J. 27 : 1824-1828.
- ENDO, A., KAKIKI, K., AND MISATO, T. 1970. Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D.J. Bacteriol. 104 : 189-196.
- FAIRBAIRN, N.J. 1953. A modified anthrone reagent. Chem. Ind. 72 : 86.
- FURTER, R. 1980. Effekte von Polyenmakrolidantibiotika auf pilzliche Chitinsynthetase. Diplomarbeit Universität Zürich.
- GLASER, L., AND BROWN, D.H. 1957. The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 228 : 729-742.
- GOODAY, G.W. 1977. Biosynthesis of the fungal wall - mechanisms and implications. J. Gen. Microbiol. 99 : 1-11.

- GOODAY, G.W. 1978. The enzymology of hyphal growth. In *The Filamentous Fungi* (J.E. Smith and D.R. Berry, Eds.), Vol. 3, Developmental Mycology, pp. 51-77. Edward Arnold, London.
- GOODAY, G.W. 1979. The action of polyoxin on fungi. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. DDR. Reihe N: 159-166.
- GOODAY, G.W., AND DE ROUSSET-HALL, A. 1975. Properties of chitin synthetase from *Coprinus cinereus*. J. Gen. Microbiol. 89 : 137-145.
- GRIFFIN, P.F., BRENNAN, P.J., AND LOESEL, D.M. 1970. Free lipids and carbohydrates of *Agaricus bisporus* mycelium. Biochem. J. 119 : 11-12.
- HAENSELER, E. 1980. Chemische Struktur der Hyphenwand von in Submerskultur gezogenem Mycelium des Kulturchampignons und deren Beeinflussung durch exogenes CO₂. Diplomarbeit Universität Zürich.
- HAENSELER, E., NYHLEN, L.E. AND RAST, D.M. 1983. Isolation and properties of chitin synthetase from *Agaricus bisporus* mycelium. Exp. Mycol.
- HASLAM, R.M., AND KLYNE, W. 1953. The precipitation of 38-hydroxysteroids by digitonin. Biochem. J. 55 : 340-346.
- HERNANDEZ, J., LOPEZ-ROMERO, E., CERBON, J., AND RUIZ-HERRERA, J. 1981. Lipid analysis of chitosomes, chitin-synthesizing microvesicles from *Mucor rouxii*. Exp. Mycol. 5 : 349-356.
- HOLTZ, R.B., AND SCHISLER, L.C. 1971. Lipid metabolism of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: I. Analysis of sporophore and mycelial lipids. Lipids 6 : 176-180.

- HORI, M., EGUCHI, J., KAKIKI, K., AND MISATO, T. 1974. Studies on the mode of action of polyoxins. VI. Effect of polyoxin B on chitin synthesis in polyoxin-sensitive and resistant strains of *Alternaria kikuchiana*. J. Antibiot. 27 : 260-266.
- ISONO, K., ASAKI, K., AND SUZUKI, S. 1969. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. The structure of polyoxins. J. Am. Chem. Soc. 91 : 7490-7505.
- JAMES, L.B. 1972. Amino acid analysis: the humin problem. J. Chromatogr. 68 : 123-130.
- JELSMA, J. 1979. Ultrastructure of glucans in fungal cell walls. Dissertation Universität Groningen.
- JOHNSON, A.R. 1971. Improved method of hexosamine determination. Anal. Biochem. 44 : 628-635.
- KANETSUNA, F., AND CARBONELL, L.M. 1970. Cell wall glucans of the yeastlike and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Bacteriol. 101 : 675-680.
- KANETSUNA, F., AND CARBONELL, L.M. 1971. Cell wall composition of the yeastlike and mycelial forms of *Blastomyces dermatitidis*. J. Bacteriol. 106 : 946-948.
- KANETSUNA, F., CARBONELL, L.M., GIL, F., AND AZUMA, I. 1974. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of *Histoplasma capsulata*. Mycopathol. Mycol. appl. 54 : 1-13.
- KATES, M. 1972. Techniques of Lipidology. American Elsevier Publ. Co., New York.
- KREBS, E.C. AND BEAVO, J.A. 1979. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. Ann. Rev. Biochem. 48 : 923-959.

- LOPEZ-ROMERO, E., RUIZ-HERRERA, J., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1978. Purification and properties of an inhibitory protein of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. Biochim. Biophys. Acta. 525 : 338-345.
- LOPEZ-ROMERO, E., RUIZ-HERRERA, J., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1982. The inhibitory protein of chitin synthetase from *Mucor rouxii* is a chitinase. Biochim. Biophys. Acta. 702 : 233-236.
- MAHADEVAN, P.R., AND TATUM, E.L. 1965. Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild-type and colonial morphology. J. Bacteriol. 90 : 1073-1081.
- MARTIN, A.J.P. 1945. Destruction and alteration of amino acid residues under conditions of protein hydrolysis. Adv. Protein Chem. 2 : 10-12.
- MCEWEN, C.R. 1967. Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradients of sucrose solution. Anal. Biochem. 20 : 114-149.
- McMURROUGH, I., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1971. Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. J. Biol. Chem. 246 : 4008-4016.
- MICHALENKO, G.O., HOHL, H.R., AND RAST, D. 1976. Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. J. Gen. Microbiol. 92 : 251-261.
- MILLS, G.L., AND CANTINO, E.C. 1981. Chitosome-like vesicles from gamma particles of *Blastocladiella emersonii* synthesize chitin. Arch. Microbiol. 130 : 72-77.
- MITCHELL, A.D., AND TAYLOR, I.E.P. 1969. Cell wall proteins of *Aspergillus niger* and *Chaetomium globosum*. J. Gen. Microbiol. 59 : 103-109.

- MOMOSE, T., UEDA, Y., SAWADA, K., AND SUGI, A. 1957. Reaction mechanism of anthrone with sugars. U.D.C. 5 : 31-36.
- MORRIS, D.L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 707 : 254-255.
- MUELLER, H., FURTER, R., ZAEHNER, H., AND RAST, D.M. 1981. Metabolic products of microorganisms. 203. Inhibition of chitosomal chitin synthetase and growth of *Mucor rouxii* by nikkomycin Z, nikkomycin X, and polyoxin A: a comparison. Arch. Microbiol. 130 : 195-197.
- MUZZARELLI, R.A.A. 1977. Chitin. Pergamon Press. Oxford/New York/Frankfurt.
- NARAHASHI, Y. 1970. Pronase. In *Methods in Enzymology* (G.E. Perlmann and L. Lorand, Eds.), Vol. 19, pp. 651-664. Academic Press, London/New York.
- NIEDERPRUEM, D.J., HAFIZ, A., AND HENRY, L. 1965. Polyol metabolism in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. J. Bacteriol. 89 : 954-959.
- O'SULLIVAN, J., AND LOESEL, D.M. 1971. Spore lipids and germination in *Agaricus bisporus*. Arch. Mikrobiol. 80 : 277-283.
- PATTERSON, J., HOLLAND, J., AND BIEBER, L.L. 1979. Studies on the competition of polyene antibiotics for sterols. J. Antibiot. 32 : 646-653.
- RAST, D., AND STAEUBLE, J.E. 1970. On the mode of action of isovaleric acid in stimulating the germination of *Agaricus bisporus* spores. New Phytol. 69 : 557-566.
- RAST, D.M., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1981. Effects of amphotericin B, nystatin, and other polyene antibiotics on chitin synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 1233-1236.

- RAST, D., STUESSI, H., AND ZOBRIST, P. 1979. Self-inhibition of the *Agaricus bisporus* spore by CO₂ and/or γ -glutaminy-4-hydroxybenzene and γ -glutaminy-3,4-benzoquinone: a biochemical analysis. *Physiol. Plant.* 46 : 227-234.
- RAST, D.M., STUESSI, H., HEGNAUER, H., AND NYHLEN, L.E. 1981a. Melanins. In *The Fungal Spore : Morphogenetic Controls* (G. Turian and H.R. Hohl, Eds.), pp. 507-531. Academic Press, London/New York.
- RAST, D.M., FURTER, R., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1981b. Effects of polyene antibiotics on chitin synthetase. *Bull. Br. Mycol. Soc.* 15 : 9.
- REISS, E., AND NICKERSON, W.J. 1974. Control of dimorphism in *Phialophora verrucosa*. *Sabouraudia* 12 : 202-213.
- RUDALL, K.M. 1955. The distribution of collagen and chitin. *Symp. Soc. Exp. Biol.* IX. *Fibrous Proteins and Their Biological Significance*. pp. 49-71. Cambridge University Press, Cambridge.
- RUIZ-HERRERA, J., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1976. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 97 : 241-249.
- RUIZ-HERRERA, J., SING, V.O., VAN DER WOUDE, W.J., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1975. Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 : 2706-2710.
- RUIZ-HERRERA, J., LOPEZ-ROMERO, E., AND BARTNICKI-GARCIA, S. 1977. Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 252 : 3338-3343.

- RUIZ-HERRERA, J., BARTNICKI-GARCIA, S., AND BRACKER, C.E.
1980. Dissociation of chitosomes by digitonin into 16 S subunits with chitin synthetase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 629 : 201-216.
- SHEPHERD, M.G., GHAZALI, H.M., AND SULLIVAN, P.A. 1980.
N-Acetyl-D-glucosamine kinase and germ-tube formation in *Candida albicans*. *Exp. Mycol.* 4 : 147-159.
- SIETSMA, J.H., AND WESSELS, J.G.H. 1977. Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta.* 496 : 225-239.
- SIETSMA, J.H., AND WESSELS, J.G.H. 1979. Evidence for covalent linkages between chitin and β -glucan in a fungal wall. *J. Gen. Microbiol.* 114 : 99-108.
- SIETSMA, J.H., AND WESSELS, J.G.H. 1981. Solubility of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D/(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glucan in fungal walls: Importance of presumed linkage between glucan and chitin. *J. Gen. Microbiol.* 125 : 209-212.
- SIETSMA, J.H., RAST, D., AND WESSELS, J.G.H. 1977. The effect of carbon dioxide on fruiting and on the degradation of a cell-wall glucan in *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Microbiol.* 102 : 385-389.
- SMITH, E.L., AND PICKELS, E.G. 1940. Micelle formation in aqueous solutions of digitonin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 26 : 272-277.
- SOLOMONS, G.L. 1975. Submerged culture production of mycelial biomass. In : *The Filamentous Fungi* (J.E. Smith and D.R. Berry, Eds.), Vol. I, pp. 249-263. Edward Arnold, London.

- STARR, P.R., AND PARKS, L.W. 1962. Effect of temperature on sterol metabolism in yeast. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 : 107-110.
- STUESSI, H., AND RAST, D.M. 1981. The biosynthesis and possible function of γ -glutaminy-4-hydroxybenzene in *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* 20 : 2347-2352.
- SUND, H., AND WEBER, K. 1963. Untersuchungen über milchzucker-spaltende Enzyme. XIII. Grösse und Gestalt der β -Galaktosidase aus *E. coli*. *Biochem. Z.* 337 : 24-34.
- SWAN, G.A. 1974. Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (W. Herz, H. Grisebach, and G.W. Kirby, Eds.), Vol. 31, pp. 521-582. Springer-Verlag, Wien/New York.
- SWANN, D.A., AND BALAZS, E.A. 1966. Determination of the hexosamine content of macromolecules with manual and automated techniques using the p-dimethylaminobenzaldehyde reaction. *Biochem. Biophys. Acta.* 130 : 112-129.
- TERENZI, H.F., AND STORCK, R. 1969. Stimulation of fermentation and yeastlike morphogenesis in *Mucor rouxii* by phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* 97 : 1248-1261.
- TRACEY, M.V. 1955. Chitin. In *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (K. Peach und M.V. Tracey, Eds.) Bd. II, pp. 264-274. Springer-Verlag, Wien/New-York.
- TSCHESCHE, R., UND WULFF, G. 1973. Chemie und Biologie der Saponine. In *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* (W. Herz, H. Grisebach and G.W. Kirby, Eds.), Vol. 30, pp. 461-606. Springer-Verlag, Wien/New York.
- UY, R., AND WOLD, F. 1977. Posttranslational covalent modifications of proteins. *Science* 198 : 890-896.

- VAN SUMERE, C.F., ALBRECHT, J., DEDONDER, A., DE POOTER, H., AND PÉ, I. 1975. Plant proteins and phenolics. In *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins* (J.B. Harborne and C.F. Van Sumere, Eds.), pp. 211-264. Academic Press, London/New York/San Francisco.
- VERMEULEN, C.A., RAVEN, M.B.J.M., AND WESSELS, J.G.H. 1979. Localization of chitin synthase activity in subcellular fractions of *Schizophyllum commune* protoplasts. J. Gen. Microbiol. 114 : 87-97.
- WEETE, J.D. 1980. Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. Plenum Press. New York/London.
- WESSELS, J.G.H. 1966. Control of cell-wall glucan degradation during development in *Schizophyllum commune*. Antonie van Leeuwenhoek 32 : 341-355.
- WESSELS, J.G.H. 1969. A β -1,6-glucan glucanohydrolase involved in hydrolysis of cell-wall glucan in *Schizophyllum commune*. Biochim. Biophys. Acta. 173 : 191-193.
- WESSELS, J.G.H., AND SIETSMA, J.H. 1981. Fungal cell walls : a survey. In *Plant Carbohydrates II* (W. Tanner and F.A. Loewus, Eds.), Encycl. Plant Physiol. N.S. Vol. 13B, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- WESSELS, J.G.H., KREGER, D.R., MARCHANT, R., REGENSBURG, B.A., AND DE VRIES, O.M.H. 1972. Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. Biochim. Biophys. Acta. 273 : 346-358.
- WULFF, G. 1968. Neuere Entwicklungen auf dem Saponingebiet. Dtsche. Apoth. Ztg. 23 : 797-808.

CURRICULUM VITAE

von Edgar Hänseler, geboren am 8. August 1953 in Herisau,
AR, Bürger von Rafz (ZH)

- | | |
|-------------|---|
| 1961 - 1967 | Primarschule Herisau |
| 1967 - 1969 | Sekundarschule Herisau |
| 1973 | Eidg. Lehrabschlussprüfung als Elektroniker
(FEAM) |
| 1973 | Eintritt in die Maturitätsschule für
Erwachsene der Akademiker-Gemeinschaft
in Zürich |
| 1975 | Eidg. Maturitätsprüfung Typus D |
| 1975 | Immatrikulation an der philosophischen
Fakultät II der Universität Zürich |
| 1980 | Diplom in Botanik |
| 1980 - 1982 | Arbeiten an der Dissertation (unter Leitung
von Prof. Dr. D.M. Rast) |
| 1978 - 1982 | Assistent am Institut für Pflanzenbiologie |

Während meines Studiums besuchte ich bei folgenden Dozenten Vorlesungen, Kurse und Praktika :

Mikrobiologie

und Botanik :

Prof. D.M. Rast, Prof. H. Wanner, Prof. H.R. Hohl, Prof. R. Bachofen, Prof. E.A. Thomas, Prof. C.D. Cook, PD Dr. B. Eller, PD Dr. T.W. Baumann, Dr. K. Schneider, Dr. W. Hanselmann, Dr. H.P. Ruffner, Dr. G. Dütsch

Molekularbiologie

und Genetik :

Prof. C. Weissmann, Prof. M. Birnstiel, PD Dr. A. Dübendorfer

Zoologie :

Prof. P. Tardent, Prof. V. Ziswiler, Prof. P.S. Chen, Prof. H. Kummer, Prof. H. Burla, Prof. R. Wehner

Chemie :

Prof. K.H. Eugster, Prof. H. Schmid, Prof. M. Viscontini, Prof. H.R. Oswald, PD Dr. E. Dubler, Dr. J.H. Bieri, Dr. H. Heimgartner, Dr. P. Rüedi, Prof. K. Grob

Biochemie :

Prof. J. Kägi, Prof. R. Humbel, Prof. Ph. Christen, Prof. H.R. Bosshard

Physikal. Chemie :

Prof. H. Fischer, Prof. G. Wagnière, Prof. H. Labhart, Dr. W. Heinzelmann

Physik :

Prof. E. Brun, Prof. W. Kündig

Mathematik :

Prof. E. Batschelet

